



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES
DE LA DNA POLIMERASA Y LA PROTEÍNA
TERMINAL DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29**

Alicia del Prado Díaz

Madrid, 2015



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA DNA POLIMERASA Y LA PROTEÍNA TERMINAL DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29

Memoria presentada por la Lda. en Bioquímica
Alicia del Prado Díaz
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM)
bajo la dirección de la Doctora Margarita Salas Falgueras
y el Doctor Miguel de Vega José

Resumen

El fago $\phi 29$ tiene un genoma lineal de DNA de doble cadena con una proteína terminal (TP) unida covalentemente a los extremos 5' (TP-DNA) que junto con una secuencia específica constituye los orígenes de replicación. Para iniciar la replicación, la DNA polimerasa forma un heterodímero con una TP libre y reconoce el origen de replicación usando como iniciador el grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP.

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\phi 29$, ha permitido la identificación de residuos de la TP que podrían ser responsables de la interacción con la DNA polimerasa. Ensayos realizados mediante análisis *in vitro* de mutantes puntuales en dichos residuos, mostraron que su sustitución tiene efecto tanto en la estabilidad del complejo TP/DNA polimerasa (R158A) como en la interacción funcional de la TP en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa (R169A, E191A, Y250A, E252A, Q253A y R256A), afectando a los primeros pasos de la replicación y permitiéndonos proponer un papel de estos residuos en el mantenimiento del equilibrio entre la estabilización del dominio iniciador de la TP y su salida gradual del centro activo de polimerización de la DNA polimerasa a medida que el nuevo DNA está siendo sintetizado.

Los ensayos realizados en esta Tesis con mutantes en la Lys529 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ mostraron su papel en garantizar la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, y como consecuencia, en la inserción del nucleótido entrante. La Lys529 también es crítica en el paso de translocación requerido para la incorporación del siguiente nucleótido. Además, podría estar regulando la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa, actuando como una barrera para prevenir el exceso de degradación del sustrato. Ensayos realizados combinando estos mutantes de la DNA polimerasa con mutantes en el residuo Glu233 de la TP nos permiten proponer que se requiere un contacto directo entre la Lys529 y el Glu233 para la iniciación de la replicación del TP-DNA y su posterior translocación para completar la replicación del genoma.

La iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ ocurre frente al segundo nucleótido en 3' de la cadena molde. Estudios previos mostraron que el dominio iniciador de la TP es el responsable de dictar la posición del molde usada para dirigir la reacción de iniciación. Los resultados obtenidos utilizando quimeras en las que se intercambiaron las hélices del dominio iniciador de la TP de $\phi 29$ con las correspondientes al fago relacionado Nf, así como mutantes de la TP del *priming-loop* de los fagos $\phi 29$ y Nf en los que se modificó la posición del residuo aromático, mostraron que el principal determinante estructural para dirigir el nucleótido interno en 3' usado como molde en la reacción de iniciación en $\phi 29$ es el residuo aromático Phe230 del *priming-loop*.

Summary

Bacteriophage ϕ 29 genome consists of a linear double-stranded DNA with a terminal protein (TP) covalently linked to each 5' end (TP-DNA) that together with a specific sequence constitutes the replication origins. To initiate replication, the DNA polymerase forms, with a free TP, a heterodimer that recognizes the origins and initiates replication using as primer the hydroxyl group of TP residue Ser232.

The 3D structure of the DNA polymerase/ TP heterodimer allowed the identification of TP residues as potential DNA polymerase ligands. In this work we have studied the role of these TP residues by *in vitro* analyses of their mutant derivatives. The results showed that substitution of these residues had an effect on either the stability of the TP/DNA polymerase complex (R158A) or in the functional interaction of the TP at the polymerization active site (R169A, E191A, Y250A, E252A, Q253A and R256A), affecting the first steps of ϕ 29 TP-DNA replication. Therefore, these TP residues are playing a role in the maintenance of the equilibrium between the TP-priming domain stabilization and its gradual exit from the polymerization active site of the DNA polymerase as the new DNA is being synthesized.

In this Thesis we have made site-directed mutants at Lys529 of the DNA polymerase of ϕ 29 to analyse its functional importance for the synthetic activities of ϕ 29 DNA polymerase. Residue Lys529 is important in guaranteeing the stabilization of the primer-terminus at the polymerization active site, and as a consequence, in the insertion of the incoming nucleotide. Its role is also critical in the translocation step required for the next incoming nucleotide incorporation. On the other hand, Lys529 could regulate the exonuclease activity of the DNA polymerase, acting as a barrier to prevent overdegradation of the substrate. In addition, combination of the DNA polymerase mutants with a TP derivative at residue Glu233 leads us to infer that a direct contact between Lys529 and Glu233 is required for the initiation of TP-DNA replication and further translocation to allow complete genome replication.

The initiation of ϕ 29 DNA replication mainly occurs opposite the second nucleotide at the 3' end of the template. Previous studies showed that the TP priming domain dictates the template position used to direct the initiation reaction. The results obtained using chimerical TPs made by interchanging individual α helices of the TP priming domain of the related phages ϕ 29 and Nf, as well as ϕ 29 mutant TPs at the priming-loop residues, indicated that the aromatic residue Phe230 of the priming-loop is the main structural determinant to direct the internal 3' nucleotide used as template in the initiation reaction.

Resumen	i
Summary.....	iii
Abreviaturas.....	ix
Glosario de términos no castellanos incluidos en esta Tesis	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. Las DNA polimerasas.....	3
1.1. Clasificación de las DNA polimerasas.....	4
1.2. Estructura general de las DNA polimerasas.....	7
1.3. Mecanismo de polimerización	8
1.4. Fidelidad de síntesis	11
2. La replicación del DNA.....	11
3. Mecanismo de iniciación mediado por proteína terminal.....	13
3.1. La replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$	13
3.2. La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$	16
3.3. Estructura de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$	17
3.4. Estructura del heterodímero DNA polimerasa/TP del bacteriófago $\phi 29$	20
3.5. Papel de la TP del bacteriófago $\phi 29$ <i>in vivo</i>	22
OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. MATERIALES	29
1.1. Nucleótidos.....	29
1.2. Proteínas	29
1.3. Sustratos de DNA y oligonucleótidos	29
2. MÉTODOS	32
2.1. Mutagénesis dirigida, expresión y purificación de mutantes puntuales y quimeras de la TP de $\phi 29$	32
2.2. Mutagénesis dirigida, expresión y purificación de las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$	33
2.3. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP).....	34
2.4. Ensayo de interferencia	35
2.5. Ensayo de cosedimentación	35
2.6. Ensayo de replicación del TP-DNA	35
2.7. Ensayos de transición	36
2.8. Ensayos de <i>sliding-back</i>	36
2.9. Ensayos de elongación truncada de los oligonucleótidos de banda simple	36
2.10. Ensayos de amplificación del TP-DNA	37
2.11. Preparación del DNA reconstituido	37
2.12. Balance de las actividades de exonucleasa 3'-5' y de polimerización 5'-3' (balance exo/pol).....	37
2.13. Ensayo de polimerización con mutantes deficientes en la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa de $\phi 29$	38
2.14. Replicación del DNA de M13: síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda	38
2.15. Medida de la afinidad por el nucleótido entrante de las DNA polimerasas mutantes.	38
2.16. Hidrólisis de 5'- <i>p</i> -nitrofenil éster de timidina 5' monofosfato (<i>pNP</i> -TMP).....	39
2.17. Ensayos de exonucleasa 3'-5'	39

2.18. Degradación exonucleolítica en un solo evento de unión	40
2.19. Ensayos de retraso en gel	40
RESULTADOS.....	41
1. Implicación de los residuos de los dominios iniciador e intermedio de la TP de ϕ 29 en la formación de un heterodímero estable y funcional con la DNA polimerasa replicativa.....	45
1.1. Mutagénesis dirigida de los residuos Arg158, Arg169, Glu191, Asp198, Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 de la TP de ϕ 29	47
1.2. Las TPs mutantes presentan defectos en la interacción con la DNA polimerasa	47
1.3. Replicación del TP-DNA. Importancia de los residuos mutados en la etapa de transición	50
1.4. Amplificación del TP-DNA. Papel de las TPs mutantes como TPs parentales	54
2. Papel dual del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA y del residuo iniciador de la TP en el centro activo de polimerización	59
2.1. Mutagénesis dirigida del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29	59
2.2. Las mutaciones introducidas en la Lys529 afectan al correcto balance entre las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa.....	60
2.3. Mutaciones en el residuo Lys529 afectan a la unión de moléculas de DNA con estructura molde/iniciador en el centro activo de polimerización.....	63
2.4. Las mutaciones en la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 favorecen la transferencia de la cadena iniciadora hacia el centro activo exonucleasa 3'-5'	64
2.5. Papel de la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 durante los primeros pasos de la replicación del TP-DNA.....	70
2.6. Los mutantes de la DNA polimerasa son incapaces de realizar correctamente la transición de iniciación con TP a elongación con DNA	72
3. Implicación de la TP parental y del dominio iniciador de la TP del heterodímero en el reconocimiento de la posición de iniciación en la replicación	77
3.1. Papel de la TP parental de ϕ 29 en el reconocimiento del primer nucleótido usado como molde en la reacción de iniciación	77
3.2. Implicación de las hélices del dominio iniciador en dictar el nucleótido interno en 3' usado como molde en la reacción de iniciación	80
3.3. Papel de la posición de los residuos aromáticos del <i>priming-loop</i> de la TP en dictar la posición del nucleótido en 3' usada como molde durante la reacción de iniciación	86
4. Implicación del dominio N-terminal y de la primera hélice del dominio intermedio en el reconocimiento del origen de replicación.....	95
4.1. Implicación de la primera hélice α del dominio intermedio de la TP en el reconocimiento del origen de replicación	95
4.2. Papel del dominio N-terminal de la TP en el reconocimiento del origen de replicación	100
DISCUSIÓN	103
1. Implicación de los residuos de los dominios intermedio e iniciador de la TP de ϕ 29 en la interacción con la DNA polimerasa.....	105
1.1. Los residuos Arg158 y Arg169 de la TP contribuyen a la estabilidad del complejo DNA polimerasa/TP	105
1.2. Implicación de los residuos Glu191 y Asp198 en la formación de un heterodímero funcional.....	107
1.3. Los residuos Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 son importantes para la interacción funcional con la DNA polimerasa en el heterodímero	107
2. Importancia de la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA.....	109

2.1. El residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 es importante para garantizar la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización y como consecuencia, en la inserción del nucleótido entrante.....	109
2.2. La Lys529 es crítica en el paso de translocación requerido para la incorporación del siguiente nucleótido entrante.....	110
2.3. La Lys529 podría regular la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa actuando como barrera para prevenir el exceso de degradación del sustrato	111
3. El contacto directo entre la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 y el Glu233 de la TP es necesario para la iniciación de la replicación del TP-DNA.....	113
4. La TP paterna no parece estar implicada en el reconocimiento del primer nucleótido que sirve de molde en la replicación de ϕ 29.	115
5. Implicación del dominio iniciador de la TP de ϕ 29 en el reconocimiento de la posición de iniciación en la replicación.	116
5.1. Las hélices del dominio iniciador no son las responsables de dictar el nucleótido que dirige la reacción de iniciación.....	116
5.2. La posición del residuo aromático del <i>priming-loop</i> está implicada en la selección del nucleótido en 3' utilizado como molde en la reacción de iniciación en ϕ 29	117
6. Papel de la TP del heterodímero en el reconocimiento del origen de replicación.....	118
6.1. La primera hélice α del dominio intermedio de la TP del heterodímero no parece estar implicada en el reconocimiento del origen de replicación	119
6.2. El dominio N-terminal de la TP no juega un papel fundamental en el reconocimiento del origen de replicación	119
CONCLUSIONES.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125

Abreviaturas

ATP: adenosina-5'-trifosfato

BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, **B**ovine **S**erum **A**lbumin)

BER: reparación por escisión de bases (del inglés, **B**ase-**E**xcision **R**epair)

cm: centímetros

C-terminal: carboxilo terminal

DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés, **D**eoxyribo**N**ucleic **A**cid)

DBP: proteína de unión a DNA de cadena doble (del inglés, Double stranded **DNA** **B**inding Protein)

dAMP: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato

dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato

dGTP: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato

dTTP: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato

dNMP: 2'-desoxinucleósido-5'-monofosfato

dNTP: 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato

ddNTP: 2',3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfato

dRP: desoxirribosa fosfato

dsDNA: DNA de cadena doble (del inglés, **D**ouble **S**tranded **DNA**)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético

h: hora

ITR: repetición terminal invertida (del inglés, **I**nverted **T**erminal **R**epetition)

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

mer: número de nucleótidos de un oligómero

min: minuto

N-terminal: amino terminal

OH: hidroxilo

p: peso

P: fosfato

PAGE: electroforesis en gel de poliacríalmida (del inglés, **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis)

pb: par de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, **P**olymerase **C**hain **R**epetition)

PHP: dominio histidinol fosfatasa asociado a la polimerasa (del inglés, **P**hosphatase **H**istidinol **P**olymerase)

pNP-TMP: éster de *p*-nitrofenil timidina monofosfato (del inglés, **p**-NitroPhenyl ester of Thymidine MonoPhosphate)

pNP: *p*-nitrofenol

PPi: pirofosfato

RNA: ácido ribonucleico (del inglés, RiboNucleic Acid)

RNasa H: ribonucleasa H

rNTP: ribonucleósido 5'-trifosfato

RT: transcriptasa reversa (del inglés, Reverse Transcriptase)

s: segundo

SDS: dodecil sulfato sódico (del inglés, Sodium Dodecyl Sulphate)

ssDNA: DNA de cadena sencilla (del inglés, Single Stranded DNA)

SSB: proteína de unión a DNA de cadena sencilla (del inglés, Single Stranded DNA Binding protein)

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés, Terminal Desoxynucleotidyl Transferase)

TP: proteína terminal (del inglés, Terminal Protein)

TP-DNA: DNA con una molécula de TP unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'.

TP-dAMP: complejo de iniciación formado por una proteína terminal y el nucleótido iniciador dAMP

TP-dNMP: complejo covalente formado por una proteína terminal y un residuo de dNMP

TPR1/TPR2: del inglés, Terminal Protein Region 1/2

Tris: trihidroximetil aminometano

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VPPA: virus de la peste porcina africana

v: volumen

wt: tipo salvaje o silvestre (del inglés, Wild Type)

Glosario de términos no castellanos incluidos en esta Tesis

Cadena leading: cadena del DNA que se sintetiza de manera continua en sentido 5'-3'.

Cadena lagging: cadena del DNA que se sintetiza de manera discontinua mediante la síntesis de fragmentos de Okazaki y en dirección contraria al avance de la horquilla de replicación.

Clamp-loader: complejo proteico asociado a la horquilla de replicación encargado de ubicar, de manera dependiente de ATP, el factor de procesividad al extremo 3' del RNA iniciador.

Downstream: término empleado para referirse a la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y cuyo extremo 5' se localiza "hacia abajo" una distancia determinada del extremo 3' de la cadena iniciadora.

Gap: espacio de ssDNA de longitud variable existente en un dsDNA.

Kit: conjunto de materiales que se requieren para un proceso determinado.

Loop: estructura flexible con forma de bucle o lazo presente en determinados dominios de algunas proteínas.

Palm, fingers y thumb: subdominios que conforman el dominio de polimerización de las DNA y RNA polimerasas, llamados así por su similitud con la palma, dedos y pulgar, de una mano derecha.

Primer: iniciador de la replicación. Puede ser un fragmento de RNA, de DNA, o el grupo hidroxilo de una proteína.

Priming-loop: *loop* en el que se localiza el residuo iniciador de la TP de $\phi 29$.

Sliding-back: término empleado para describir el mecanismo por el cual la DNA polimerasa de $\phi 29$ se transloca en sentido opuesto del complejo TP-dAMP tras la reacción de iniciación que ocurre frente a la segunda base de la cadena molde para recuperar la información aportada por el primer nucleótido.

Sliding-clamps: proteínas que interaccionan con las DNA polimerasas estabilizando su unión al DNA. Confieren una alta procesividad al proceso de replicación.

Upstream: en esta Tesis, cadena de DNA hibridada con la cadena molde y cuyo extremo 3' es utilizado como iniciador de la replicación por la DNA polimerasa.

Wild-type: tipo natural o salvaje, sin modificación genética.

INTRODUCCIÓN

La información genética en la mayoría de los organismos vivos se encuentra almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA). La transmisión de dicha información es vital para la supervivencia de todas las especies conocidas para lo cual se requiere la duplicación del DNA en un proceso conocido como replicación, así como el mantenimiento de la integridad del mismo mediante diferentes mecanismos de reparación. En la replicación del DNA intervienen diferentes enzimas y factores proteicos. En los organismos cuyo genoma es DNA (desde bacteriófagos a eucariotas) las DNA polimerasas son las encargadas de replicar el genoma de manera precisa, catalizando la adición de desoxirribonucleósidos monofosfato (dNMPs) en el extremo de un iniciador de manera complementaria a una de las cadenas de DNA que actúa como molde. Las DNA polimerasas son componentes centrales en la replicación y reparación del DNA y su función está universalmente conservada, pudiendo ser incluso una de las primeras actividades enzimáticas en aparecer en la evolución (revisado en Steitz, 1999).

1. Las DNA polimerasas

El primer ejemplo conocido de estas enzimas fue la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, descubierta en 1956 por el grupo de Arthur Kornberg (Bessman *et al.*, 1956). A pesar de la gran diversidad existente entre las DNA polimerasas, la gran mayoría de ellas comparten una serie de características comunes (Kornberg y Baker, 1992):

- Utilización de **nucleótidos** (dNTPs): Para llevar a cabo la reacción de polimerización son necesarios los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Estos son insertados como desoxirribonucleósidos monofosfato (dNMP) liberando los fosfatos β y γ en forma de pirofosfato (PPi). Algunas son capaces de utilizar ribonucleótidos (rNTPs) con gran eficiencia, como la Pol μ (Ruíz *et al.*, 2003) o la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Boule *et al.*, 2001).
- Requerimiento de un **molde**: La reacción de polimerización es una reacción dirigida por una cadena molde que es copiada siguiendo las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick, dictando el orden de incorporación de los nucleótidos. No obstante, se han visto que algunas DNA polimerasas pueden llevar a cabo la síntesis de DNA en ausencia de molde, como la TdT o la Pol μ (Bollum, 1960; Domínguez *et al.*, 2000).
- Necesidad de **cofactores**: Para que tenga lugar la reacción de adición de nucleótidos se requiere la presencia de iones metálicos divalentes. Las DNA polimerasas utilizan preferentemente Mg^{2+} , aunque la catálisis también se realiza en presencia de Mn^{2+} (Steitz *et al.*, 1994).
- Necesidad de un **primer o iniciador**: Las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis *de novo*; necesitan un iniciador que aporte un grupo 3'-OH al que adicionar los nucleótidos. Este

iniciador puede ser una molécula de DNA, RNA o el grupo hidroxilo de un aminoácido específico (Ser, Thr o Tyr) de una proteína terminal (Salas, 1991).

- **Direccionalidad:** Las DNA polimerasas únicamente catalizan la síntesis de DNA en sentido 5'-3'.

1.1. Clasificación de las DNA polimerasas

En base a la homología en su estructura primaria (Braithwaite y Ito, 1993; Delarue *et al.*, 1990; Ito y Braithwaite, 1991), a su sensibilidad a drogas e inhibidores, así como al análisis de su estructura cristalográfica (Joyce y Steitz, 1994), las DNA polimerasas han sido clasificadas en siete familias diferentes: A, B, C, D, X, Y y transcriptasas reversas (RT) (revisado en Rothwell y Waksman, 2005):

Familia A: La familia A incluye DNA polimerasas replicativas y de reparación. También conocidas como DNA polimerasas de tipo I o procariotas, por su homología con la DNA polimerasa I (Pol I) de *E. coli*, codificada por el gen *polA*. Algunas polimerasas replicativas que pertenecen a esta familia son la DNA polimerasa de los bacteriófagos T3, T5 y T7 (Figura 1), que interaccionan con otras proteínas para llevar a cabo la replicación del DNA. La DNA polimerasa mitocondrial eucariótica γ que también pertenece a esta familia, lleva a cabo tanto la replicación como la reparación del DNA mitocondrial (Graziewicz *et al.*, 2006); también presenta actividad 5'desoxirribosa fosfato-liasa (dRP-liasa), implicada en los procesos de reparación por escisión de bases (BER) en las mitocondrias (Bogenhagen *et al.*, 2001; Longley *et al.*, 1998). En cuanto a DNA polimerasas de la familia A implicadas en procesos de reparación encontramos además de la Pol I de *E. coli*, a la Pol I de *Thermus aquaticus* (Taq), la Pol I de *Bacillus stearothermophilus* y la Pol θ humana (Chan *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2014). La Pol ν humana parece estar implicada en la síntesis a través de lesiones (Yamanaka *et al.*, 2010).

Algunas de las DNA polimerasas de esta familia están implicadas en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, presentando actividad exonucleasa 5'-3', así como también actividad exonucleasa 3'-5' o correctora de errores, que elimina durante la síntesis del DNA los nucleótidos incorporados erróneamente.

Familia B: También denominadas DNA polimerasas tipo II por su homología con la DNA polimerasa II (Pol II) de *E. coli*, codificada por el gen *polB*. Conocidas como eucarióticas o de tipo α por su similitud con la DNA polimerasa α de eucariotas. Sus miembros se subdividen en tres clases: celulares, como las DNA polimerasas eucarióticas α , δ , ϵ y ζ ; bacterianas/virales como la Pol II de *E. coli*, las DNA polimerasas de los fagos T4 y RB69 (Figura 1) o las de los virus Vaccinia o Herpes; y el subgrupo de DNA polimerasas que inician

la replicación utilizando como iniciador el grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo específico (Ser, Thr o Tyr) de una proteína terminal (TP).

Exceptuando la Pol ζ (Lawrence, 2004; Nelson *et al.*, 1996), que está implicada en procesos de síntesis a través de lesiones en el DNA, el resto de polimerasas eucarióticas (α , δ , ϵ) son las encargadas de llevar a cabo la replicación del DNA nuclear (revisado en Garg y Burgers, 2005). La Pol α posee actividad primasa que le permite sintetizar pequeños cebadores de RNA, que son extendidos por su propia actividad polimerasa y que sirven de iniciadores para otras polimerasas como Pol δ y Pol ϵ . Al subgrupo de DNA polimerasas que inician con TP pertenecen las polimerasas de los bacteriófagos $\phi 29$, PRD-1 y Cp-1, algunos virus eucariotas como adenovirus y hepadnavirus, cromosomas lineales de bacterias como *Streptomyces lividans* (revisado en Salas, 1991) y halovirus (Bamford *et al.*, 2005).

Las DNA polimerasas de esta familia se caracterizan por una potente actividad exonucleasa 3'-5', que puede llegar a ser hasta 1000 veces mayor que la descrita en las DNA polimerasas de la familia A (Capson *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994). En células eucariotas, las DNA polimerasas replicativas de la familia B suelen estar formando parte de un complejo multiproteico (replisoma) en el que están presentes, entre otros, factores de procesividad, helicasas y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (Kornberg y Baker, 1992).

Familia C: Presentan homología con la Pol III de *E. coli*, cuya subunidad catalítica (subunidad α) (Figura 1) es codificada por el gen *polC*. Las DNA polimerasas de esta familia son las encargadas de replicar el cromosoma bacteriano (Kornberg y Baker, 1992). Como ocurre con otras DNA polimerasas replicativas, interaccionan con otras proteínas y forman complejos multiproteicos. A esta familia pertenecen las DNA polimerasas replicativas de la mayoría de las bacterias Gram-positivas, como la Pol III de *Bacillus subtilis*.

Familia D: La familia D incluye DNA polimerasas de arqueas. Son enzimas heterodiméricas (Uemori *et al.*, 1997), la subunidad más pequeña presenta cierta homología con la DNA polimerasa δ eucariótica (Cann *et al.*, 1998), mientras que la subunidad mayor contiene la región catalítica. El estudio de la DNA polimerasa II de *Pyrococcus furiosus* mostró que esta enzima posee actividad polimerasa y actividad exonucleasa 3'-5', sugiriendo que en algunas arqueas pueda estar implicada en la replicación del genoma (Uemori *et al.*, 1997).

Familia X: Las DNA polimerasas de la familia X están implicadas en procesos de reparación del DNA y se encuentran en toda la escala evolutiva (Uchiyama *et al.*, 2009), desde los miembros presentes en mamíferos: β (Abbotts *et al.*, 1988), λ (García-Díaz *et al.*, 2000) (Figura 1), μ (Domínguez *et al.*, 2000) y TdT (Bollum, 1960), hasta la presencia de estas enzimas en arqueas, bacterias y virus como las de la peste porcina africana (VPPA) (Oliveros *et al.*, 1997) o la PolX de *B. subtilis* (Baños *et al.*, 2008a; Baños *et al.*, 2008b). Llevan a cabo una

síntesis distributiva del DNA sobre estructuras molde/iniciador, donde incorporan solo uno o varios nucleótidos antes de disociarse.

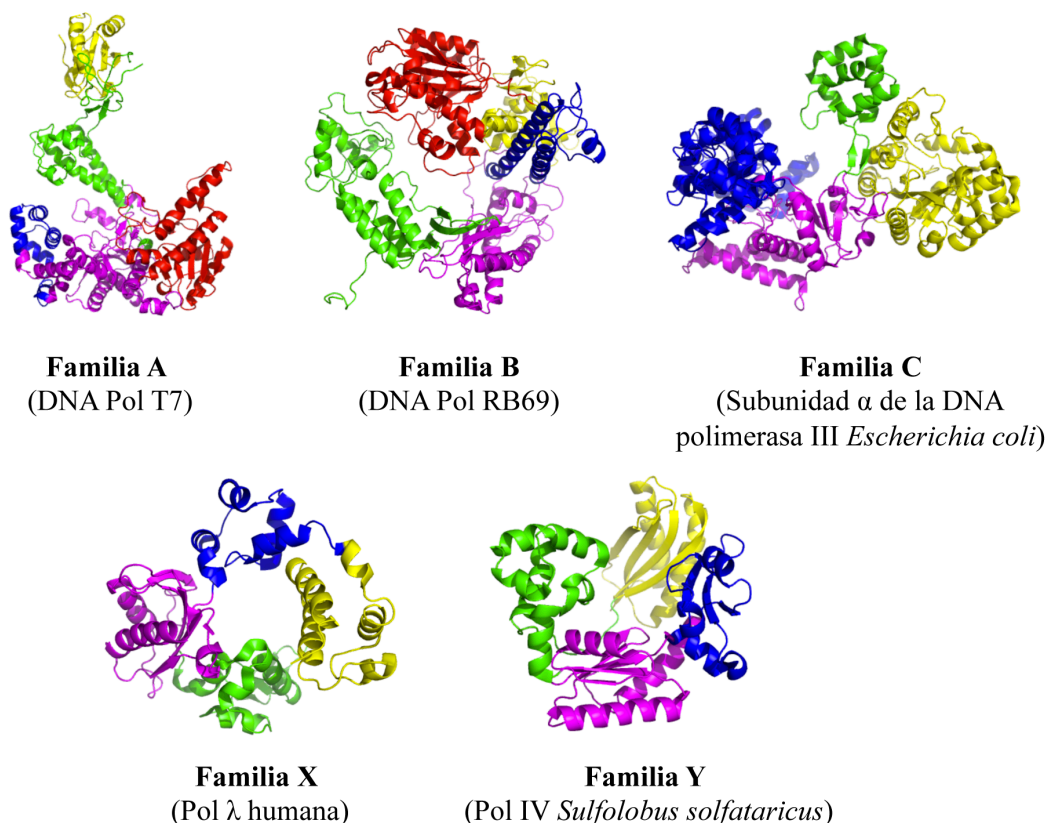


Figura 1: Estructura de las DNA polimerasas pertenecientes a diferentes familias. Se representan la DNA polimerasa del fago T7 (familia A, PDB 1T7P), la DNA polimerasa del fago RB69 (familia B, PDB 1WAI), la subunidad α de la DNA polimerasa III de *Escherichia coli* (familia C, PDB 2HQA), la DNA polimerasa λ humana (familia X, PDB 1XSN) y la DNA polimerasa IV de *Sulfolobus solfataricus* o Dp04 (familia Y, PDB 1JX4). Los subdominios *palm*, *thumb* y *fingers* del dominio de polimerización se muestran en rosa, verde y azul, respectivamente. El dominio exonucleasa se muestra en rojo. En amarillo se representan los subdominios específicos de cada una de las familias de DNA polimerasas, como el dominio de unión a tiorredoxina de la DNA polimerasa de T7, el dominio N-terminal de RB69, el dominio PHP de la subunidad α de la DNA polimerasa III de *E.coli*, el dominio de 8 kDa de la pol λ humana y el dominio *little finger* de la DNA polimerasa IV de *S.solfataricus*. La representación se realizó mediante el software Pymol (<http://pymol.org>)

Son polimerasas relativamente pequeñas. Su estructura general se compone de dos dominios: un dominio N-terminal de 8 kDa, responsable de unir específicamente el extremo 5' fosfato *downstream* de una estructura tipo *gap* (Sawaya *et al.*, 1997) y un dominio C-terminal de polimerización organizado en los tres subdominios conservados *fingers*, *palm* y *thumb*. En algunos casos en el dominio N-terminal se aloja la actividad dRP-liasa.

Familia Y: Las DNA polimerasas de la familia Y juegan un papel importante en la síntesis del DNA a través de lesiones y se encuentran presentes tanto en bacterias (Pol IV y V de *E.coli*) como en arqueas (Dp04: Pol IV de *Sulfolobus solfataricus*) (Figura 1) y eucariotas (ι , κ , η y Rev1) (Yang, 2003). Sus distintos miembros difieren entre sí en su especificidad por el tipo de lesión sobre el que actúan y por el espectro de mutaciones que generan. Debido a su

capacidad de llevar a cabo la síntesis de DNA sobre sustratos dañados, favorecen la supervivencia de la célula y su diversidad genética (revisado en Lehmann, 2006; Moldovan *et al.*, 2007). Presentan elevadas tasas de error como consecuencia de su baja eficiencia catalítica y su baja fidelidad de inserción debido a la conformación de su centro activo, el cual es más abierto y expuesto al solvente que en otras DNA polimerasas, permitiéndoles acomodar lesiones. Además carecen de actividad exonucleasa 3'-5' (Zhou *et al.*, 2001). La interacción con los factores de procesividad de la célula es fundamental para su función *in vivo* (Dionne *et al.*, 2003; Haracska *et al.*, 2001; Indiani *et al.*, 2005).

Familia de las Transcriptasas Reversas (RTs): Esta familia incluye las transcriptasas reversas de los retrovirus y las telomerasas eucarióticas. Interaccionan con distintos sustratos para convertir un genoma viral de RNA de cadena sencilla en un DNA de doble cadena (Götte *et al.*, 1999). Se han descrito tanto polimerasas monoméricas (como la del Virus de la Leucemia Murina de Moloney: MuLV) como diméricas (como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana: VIH). Ambas presentan un dominio polimerasa y un dominio RNasa H que degrada el RNA viral durante la síntesis de DNA (Moelling *et al.*, 1971).

Las telomerasas eucarióticas son las DNA polimerasas encargadas de la replicación de los telómeros (extremo de los cromosomas). Presentan en su estructura un componente de RNA que utilizan como molde en el proceso de replicación de los telómeros (Blackburn, 2001; Collins y Mitchell, 2002).

Recientemente se ha descrito una nueva DNA polimerasa (Primpol) perteneciente a la familia AEP (*Archaeo-Eukaryotic primases*) que tiene un papel en la síntesis a través de lesiones tanto del DNA mitocondrial como nuclear, así como en la replicación de estos genomas gracias a su capacidad de reiniciar la síntesis del DNA de horquillas de replicación bloqueadas (García-Gómez *et al.*, 2013; Mourón *et al.*, 2013).

1.2. Estructura general de las DNA polimerasas

La primera actividad DNA polimerasa se identificó en 1956 en *E. coli* (Bessman *et al.*, 1956; Lehman *et al.*, 1958). A esta enzima posteriormente se le llamó DNA polimerasa I (Pol I). La porción C-terminal de la Pol I de *E. coli* se denomina fragmento Klenow y carece de actividad exonucleasa 5'-3' (Klenow y Overgaard-Hansen, 1970), siendo la primera estructura de una DNA polimerasa en ser resuelta cristalográficamente (Ollis *et al.*, 1985). Gracias a la resolución de su estructura cristalográfica se identificaron dos dominios estructuralmente diferenciados: el dominio de polimerización (C-terminal) y el dominio exonucleasa 3'-5' (N-terminal). Estudios estructurales realizados con el fragmento Klenow ya mostraron que la disposición estructural del dominio de polimerización se asemeja a una mano derecha ligeramente abierta con tres subdominios diferenciados: *palm*, *thumb* y *fingers* (Ollis *et al.*, 1985). La posterior resolución cristalográfica de otras DNA polimerasas mostraron que esta

topología está universalmente conservada entre las diferentes familias de DNA polimerasas (ver Figura 1), a pesar de su baja homología de secuencia (Steitz, 1999).

El subdominio ***palm*** está formado por láminas β antiparalelas que forman la parte basal de la DNA polimerasa, flanqueadas en ambos extremos por hélices α (revisado en Joyce y Steitz, 1994; Joyce y Steitz, 1995). Es el subdominio más conservado. En él se encuentra el centro activo de polimerización, que contiene los aminoácidos que coordinan los iones metálicos catalíticos necesarios para la adición de los nucleótidos (Steitz *et al.*, 1994), así como los residuos implicados en la unión del extremo 3' de la cadena iniciadora y del fosfato α del dNTP entrante (revisado en Joyce y Steitz, 1995). Además de su papel catalítico, monitoriza la correcta formación del nuevo par de bases comprobando la complementariedad de tamaño y forma con la estructura del “bolsillo” que los aloja.

El subdominio ***fingers*** es helicoidal. Se une a la cadena molde que está siendo copiada ayudando a su correcto posicionamiento en el centro activo de forma adecuada para el correcto apareamiento con la base del dNTP entrante (Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Kohlstaedt *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997). Es el principal responsable de la unión y estabilización del nucleótido entrante, ya que contiene residuos básicos que interaccionan electrostáticamente con los fosfatos del dNTP correcto.

El subdominio ***thumb*** es importante para la unión del DNA. Es principalmente helicoidal. Es el responsable de estabilizar el complejo DNA polimerasa/DNA a través de su unión al surco menor del dúplex de DNA que está siendo sintetizado (Beese *et al.*, 1993; Jacobo-Molina *et al.*, 1993). La flexibilidad del dominio *thumb* podría ser importante para permitir el acceso de la estructura molde/iniciador al centro activo, así como la translocación del producto tras la incorporación del nucleótido. Además, es el responsable de la coordinación entre las actividades de polimerización y exonucleólisis en las DNA polimerasas que presentan actividad exonucleasa 3'-5' (Bedford *et al.*, 1997; Beese *et al.*, 1993; Franklin *et al.*, 2001; Minnick *et al.*, 1996; Pérez-Arnaiz *et al.*, 2006; Shamoo y Steitz, 1999).

Además del dominio de polimerización, muchas DNA polimerasas poseen actividades nucleolíticas que normalmente forman parte de la misma cadena polipeptídica, en subdominios adicionales. Por ejemplo, en las familias A, B y C se ha descrito un dominio con actividad exonucleasa 3'-5' en posición N-terminal (Bernad *et al.*, 1989).

1.3. Mecanismo de polimerización

El primer paso en la síntesis del DNA es la unión de una estructura dúplex molde/iniciador a la DNA polimerasa. Esta unión provoca un cambio conformacional en el subdominio *thumb*, haciendo que interaccione con el DNA a través del surco menor estabilizando la unión DNA polimerasa/DNA (Bebenek *et al.*, 1997; Doubliè *et al.*, 1999; Shamoo y Steitz, 1999). El siguiente paso es la unión del nucleótido correcto para formar el

complejo ternario. Esta unión provoca cambios conformacionales tanto en el DNA dúplex como en la DNA polimerasa, gracias a los cuales el centro activo adopta la geometría correcta para que se lleve a cabo la catálisis. El subdominio *fingers* se mueve hacia el centro activo de polimerización cambiando de una conformación abierta (en ausencia de nucleótido) a una conformación cerrada, catalíticamente activa (Doubliè *et al.*, 1999; Doubliè *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1994), tal y como se observa en la Figura 2. Este movimiento del *fingers*, permite el acercamiento entre el nucleótido entrante y el nucleótido complementario del molde, generándose el “bolsillo de unión” del par de bases naciente. La estabilización del cambio conformacional del subdominio *fingers* confiere a la DNA polimerasa la capacidad de discriminar entre un nucleótido correcto y uno incorrecto, jugando un papel importante en la fidelidad de síntesis del DNA (revisado en Kunkel, 2004; Kunkel y Bebenek, 2000). De hecho, no se ha observado este cambio conformacional en DNA polimerasas con baja fidelidad como las de la familia Y (Beard y Wilson, 2003).

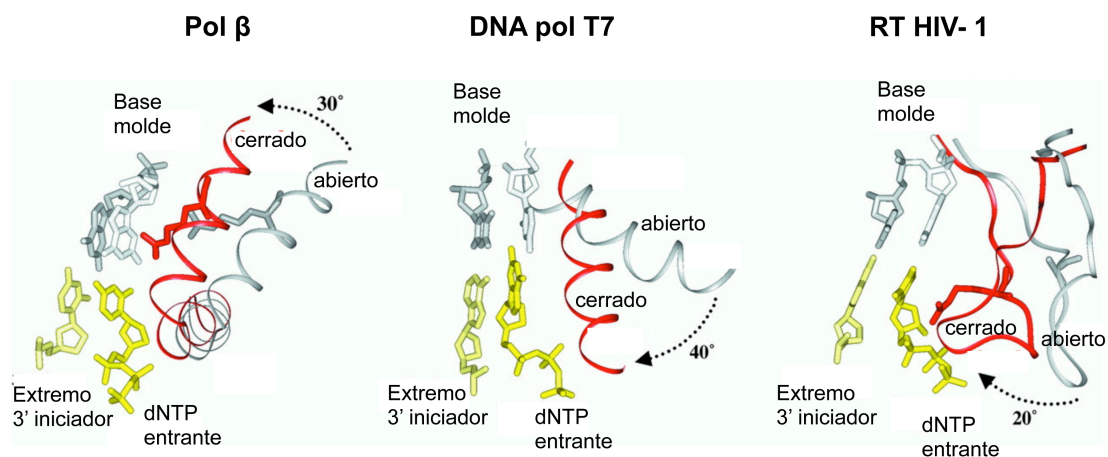


Figura 2: Cambios conformacionales del subdominio *fingers* de las DNA polimerasas. En la figura se observa el movimiento del subdominio *fingers* de las DNA polimerasas β, del bacteriófago T7 y de la retrotranscriptasa de HIV-I, tras la unión del dNTP entrante. Este movimiento permite la formación del “bolsillo de unión” del par de bases nacientes. (Adaptado de Kunkel y Bebenek, 2000).

Estudios estructurales, así como comparaciones de secuencia entre diferentes DNA polimerasas, sugirieron una reacción de polimerización común para todas las DNA polimerasas dependiente de dos iones metálicos divalentes (metal A y metal B) (Beese y Steitz, 1991; Steitz *et al.*, 1994) por analogía con el mecanismo catalítico de la reacción de exonucleasas 3'-5' catalizada por algunas DNA polimerasas (Beese y Steitz, 1991; Freemont *et al.*, 1988). Estos dos iones están coordinados por tres aspárticos conservados en las DNA polimerasas (Doubliè *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2001). El metal A es coordinado por el extremo 3'-OH de la cadena iniciadora, disminuyendo el pK_a del grupo hidroxilo, promoviendo su desprotonación y generando un oxoanión que atacará el fosfato α del nucleótido entrante. El metal B está implicado en la liberación del PPi (fosfatos β y γ del dNTP) generado tras la reacción. Ambos

metales coordinan y estabilizan la estructura y la carga del estado de transición pentacovalente que se forma en el transcurso de la reacción (Figura 3). Finalmente, se produce la transferencia del nucleótido al extremo 3'-OH del iniciador con la consecuente liberación del PPi y la translocación del DNA una posición “hacia atrás” para empezar un nuevo ciclo de polimerización (Steitz y Yin, 2004). Los productos de esta reacción son una cadena de DNA elongada un nucleótido y una molécula de PPi.

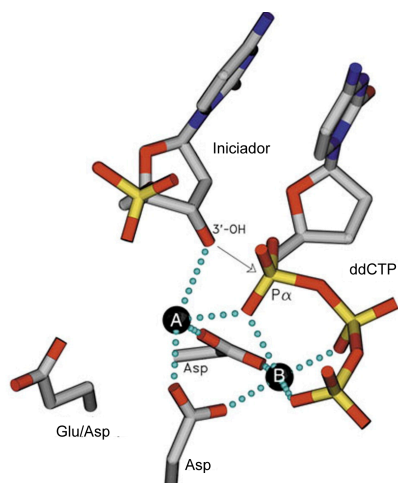


Figura 3: Mecanismo de polimerización dependiente de dos iones metálicos. Las posiciones de los metales A y B, el nucleótido entrante (ddCTP) y los grupos carboxilo de los tres residuos catalíticos conservados en las DNA polimerasas aparecen indicados. Las líneas discontinuas muestran las interacciones entre los diferentes componentes. (Adaptado de Doublie *et al.*, 1999).

Estudios cristalográficos recientes realizados en DNA polimerasas de la familia X e Y sugieren la existencia de un tercer metal en el mecanismo de polimerización (Freudenthal *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2012) (Figura 4). La posición del sitio de unión del tercer metal sugiere un posible papel del mismo en promover la reacción de pirofosforólisis (Freudenthal *et al.*, 2013). Estudios estructurales y bioquímicos realizados con DNA polimerasas de la familia B, como RB69 (Zakharova *et al.*, 2004) o $\phi 29$ (Santos *et al.*, 2014), apoyan el papel de este tercer metal como una característica general del mecanismo de polimerización.

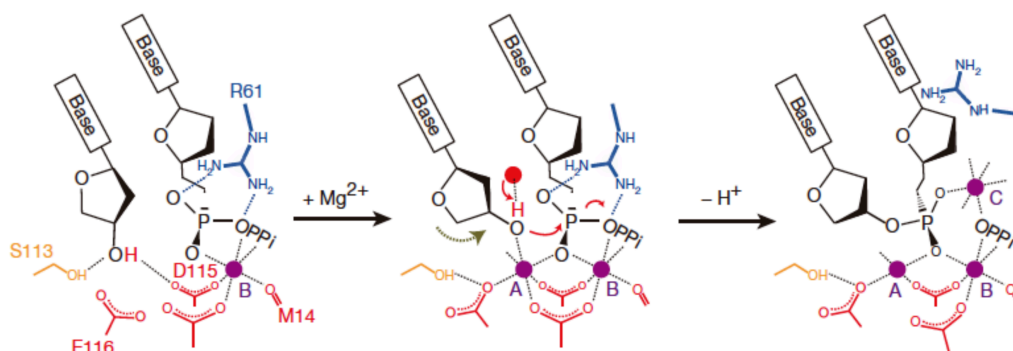


Figura 4: Mecanismo de polimerización dependiente de tres iones metálicos. En la figura se muestra el mecanismo de polimerización propuesto en Nakamura *et al.* (2012) en el que participa un tercer metal catalítico. Está descrito en la DNA polimerasa η de la familia Y. (Tomado de Nakamura *et al.*, 2012).

1.4. Fidelidad de síntesis

La fidelidad de replicación del DNA es clave en la estabilidad de los genomas, en la evolución de las especies y en el origen de las enfermedades humanas. La tasa de error por sustitución de bases de la maquinaria de replicación *in vivo* oscila entre 10^{-7} y 10^{-8} (Schaaper, 1993). Existen una serie de características comunes que son importantes en la fidelidad de síntesis de las DNA polimerasas, como la fidelidad de la inserción donde destaca la selección geométrica del par de bases naciente, la afinidad por el nucleótido, la extensión de desapareamientos y la actividad exonucleolítica correctora de errores (Kunkel y Bebenek, 2000). Las DNA polimerasas presentan una mayor afinidad por el dNTP correcto que por el incorrecto. Esta selectividad se alcanza mediante el apareamiento entre el dNTP entrante y la base molde, y depende fundamentalmente de la geometría de este par de bases (Goodman, 1997) ya que el centro activo de las DNA polimerasas está preparado para alojar estructuras geométricamente equivalentes a los pares de bases de Watson-Crick y rechazar los pares de bases que difieran de esta geometría (Kunkel y Bebenek, 2000).

La incorporación del nucleótido entrante induce cambios conformacionales en el subdominio *fingers*, que pasa de una conformación abierta a otra cerrada formándose un complejo catalíticamente competente. La unión de un nucleótido incorrecto causa alteraciones geométricas en el centro activo de la polimerasa y desestabiliza la doble hélice, disminuyendo la velocidad de síntesis del DNA hasta 10^4 veces (Johnson y Beese, 2004). Esta parada en la polimerización permite al extremo 3' de la cadena iniciadora moverse hacia el centro activo exonucleasa 3'-5', dirigido por residuos del subdominio *thumb* (Franklin *et al.*, 2001; Shamoo y Steitz, 1999) donde el error es eliminado de nuevo mediante un mecanismo de dos iones metálicos (revisado en Beese y Steitz, 1991; Freemont *et al.*, 1988; Kunkel y Bebenek, 2000; Steitz, 1999). Una vez escindido el nucleótido incorrecto del extremo 3' de la cadena iniciadora, ésta regresa al centro activo de polimerización para ser elongada (Franklin *et al.*, 2001). El equilibrio entre extensión y escisión del error incorporado es determinante para la fidelidad de síntesis, por lo que se requiere una adecuada coordinación entre ambas actividades (Kunkel y Bebenek, 2000; Wong *et al.*, 1991). Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad exonucleasa correctora de errores mejora la fidelidad de la replicación (Bebenek y Kunkel, 1995). También se ha descrito la existencia de proteínas accesorias que pueden modular la fidelidad de síntesis del DNA (Bebenek *et al.*, 2002). Además, algunos daños pueden ser tolerados gracias a la acción de polimerasas que actúan en la síntesis del DNA a través de lesiones (Friedberg *et al.*, 2002; Goodman, 2002).

2. La replicación del DNA

La replicación del DNA es el proceso de duplicación del material genético. Es un proceso semiconservativo llevado a cabo por las DNA polimerasas replicativas, que utilizan una

cadena de DNA como molde para la síntesis de la cadena complementaria. Esta naturaleza semiconservativa hace necesaria la separación de los dos cadenas del DNA, para dar lugar a dos cadenas de banda simple que servirán de molde para la síntesis del DNA.

La replicación comienza con el reconocimiento del origen de replicación. En procariotas existe un único origen de replicación, mientras que en eucariotas existen múltiples orígenes distribuidos a lo largo de todo el genoma. El reconocimiento del origen de replicación se lleva a cabo por proteínas que reconocen secuencias específicas de estos orígenes, que además de facilitar la apertura de la doble cadena, reclutan otras proteínas necesarias para la replicación. Así, las **helicadas** se encargan de la separación de la doble hélice del DNA en un proceso dependiente de ATP (revisado en Donmez y Patel, 2006). El DNA de banda simple que se genera es recubierto por las **SSBs** (proteínas de unión a banda simple), que protegen a este DNA frente a la acción de nucleasas (Wold, 1997). Las **primasas** son RNA polimerasas dependientes de DNA capaces de sintetizar pequeños fragmentos de RNA que sirven como iniciadores de la replicación (revisado en Frick y Richardson, 2001). Los **factores de procesividad** o *sliding-clamps* son proteínas que interaccionan con las DNA polimerasas estabilizando su unión al DNA. Confieren una alta procesividad al proceso de replicación. A pesar de que no presentan homología de secuencia, la mayoría de ellos presenta una arquitectura común en forma de anillo por donde se enhebra el dúplex de DNA (Kuriyan y O'Donnell, 1993). Estos factores son colocados en el DNA por otras proteínas denominadas *clamp loaders*, en un proceso dependiente de ATP (Bowman *et al.*, 2005).

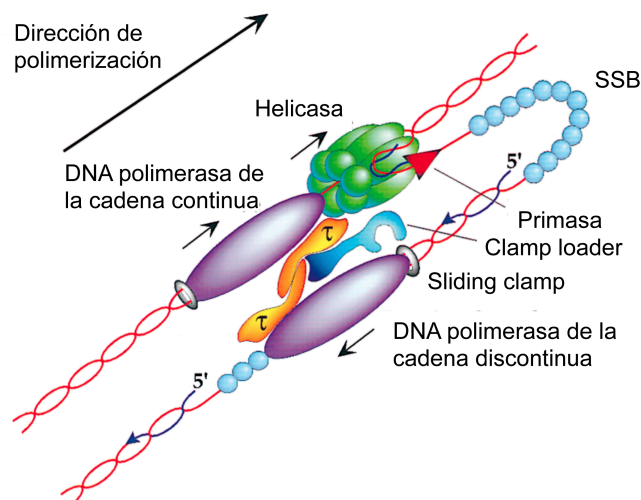


Figura 5: Modelo de replisoma bacteriano. La figura muestra un esquema del replisoma de *Escherichia coli*. El DNA está representado en rojo, y los iniciadores de RNA en azul. Las flechas indican la dirección del movimiento de la DNA polimerasa con respecto al molde de DNA. (Adaptado de Baker y Bell, 1998)

Debido a la naturaleza antiparalela del DNA, una de las cadenas es sintetizada de forma continua siguiendo la misma dirección de avance que la horquilla de replicación y otra se sintetiza de manera discontinua, en sentido opuesto al avance de la horquilla de replicación,

mediante la formación de los fragmentos de Okazaki (revisado en Baker y Bell, 1998; Johnson y O'Donnell, 2005; Pomerantz y O'Donnell, 2007) (Figura 5).

3. Mecanismo de iniciación mediado por proteína terminal

Como se explicó anteriormente, las DNA polimerasas no pueden comenzar *de novo* la síntesis del DNA, siendo necesaria la presencia de un grupo 3'-OH para poder iniciar la replicación. Además, sintetizan DNA exclusivamente en la dirección 5'-3'. Estas características de las DNA polimerasas crean un problema en la replicación de los genomas lineales (Olovnikov, 1973; Watson, 1972), ya que una vez eliminado el fragmento terminal utilizado como iniciador, quedaría en el extremo del genoma un fragmento de DNA de cadena sencilla sin copiar. Esto provocaría un acortamiento continuo de los extremos del genoma tras sucesivas rondas de replicación y por tanto, la pérdida de la información genética contenida en ellos. Para que esto no ocurra, se han desarrollado mecanismos en los organismos con genomas lineales para evitar la pérdida del material genético en sus extremos 5'. Algunos de ellos están basados en la presencia de secuencias repetidas (ITR, *Inverted Terminal Repeat*) en los extremos de los cromosomas, que les permiten la formación de concatémeros como es el caso del fago T7 (Schlegel y Thomas, 1972), o circularizarse como el fago λ (Taylor y Wegrzyn, 1995). En eucariotas superiores, la telomerasa previene el acortamiento de los extremos de los cromosomas, utilizando sucesivamente su propio fragmento RNA como molde (Kornberg y Baker, 1992).

Otros organismos como algunos fagos (ϕ 29, Nf, GA-1, Cp-1 o PRD1), virus animales (adenovirus o hepadnavirus), plásmidos lineales de bacterias, hongos y plantas superiores, así como de *Streptomyces spp.*, han resuelto el problema de la replicación de sus extremos lineales, combinando las ITR con la existencia de una proteína unida covalentemente a sus extremos 5', a la que se denomina proteína terminal (TP) (Salas, 1991; Salas, 1999; Salas *et al.*, 1996). En estos casos, el iniciador es el grupo 3'-OH de una serina, treonina o tirosina de la TP (Salas, 1991). Esta TP queda unida covalentemente a los extremos 5' (TP-DNA) (Salas *et al.*, 1978) y junto a las ITR forma parte del origen de replicación. El bacteriófago ϕ 29 es el ejemplo más estudiado de replicación con proteína terminal, y ha servido como modelo para entender las reglas que gobiernan los primeros pasos de la replicación del TP-DNA.

3.1. La replicación del DNA del bacteriófago ϕ 29

El bacteriófago ϕ 29 es un virus lítico de la familia *Podoviridae* que infecta a la bacteria *Bacillus subtilis*. Presenta un genoma lineal de doble cadena de 19285 pares de bases (pb) con una TP unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5' (TP-DNA) (Salas, 1991). Esta TP (TP parental) junto con una secuencia específica de 12 pb que contiene una ITR de 6 pb (3'TTTCAT) forma los orígenes de replicación (Gutiérrez *et al.*, 1986b). La replicación

comienza con la unión de la proteína p6 (DBP) a los orígenes de replicación situados en los extremos del genoma, promoviendo su apertura local (Serrano *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1990). En la Figura 6 se muestra un esquema de la replicación del origen izquierdo del DNA del fago. Los orígenes de replicación son reconocidos por el heterodímero formado por la DNA polimerasa con una molécula de TP libre (TP iniciadora), que es estabilizado por iones NH_4^+ (Blanco *et al.*, 1987). La DNA polimerasa utiliza el grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP (residuo iniciador), para catalizar la adición del primer nucleótido (dAMP) en la reacción de iniciación (Blanco *et al.*, 1984; Hermoso *et al.*, 1985). Esta reacción está dirigida por el segundo nucleótido en 3' de la cadena molde (la segunda T del extremo 3' terminal: 3' TTT) (Méndez *et al.*, 1992). Posteriormente, mediante un mecanismo de *sliding-back*, el producto de iniciación, TP-dAMP, se transloca retrocediendo una posición hacia atrás para recuperar la información correspondiente a la primera T del extremo 3' terminal (Figura 7). Después, la segunda T sirve como molde para la incorporación directa del segundo nucleótido. Este mecanismo requiere una reiteración de al menos dos nucleótidos en los extremos 3' de la cadena molde y es una forma de prevenir mutaciones en los extremos 3' del TP-DNA de $\phi 29$ durante la iniciación, ya que la exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa no puede corregir el nucleótido unido a la TP (Esteban *et al.*, 1993). Además, garantiza la fidelidad de la reacción de iniciación, ya que la DNA polimerasa forma el complejo correcto TP-dAMP solo 10^2 - 10^3 veces más eficientemente que cualquiera de los otros complejos posibles.

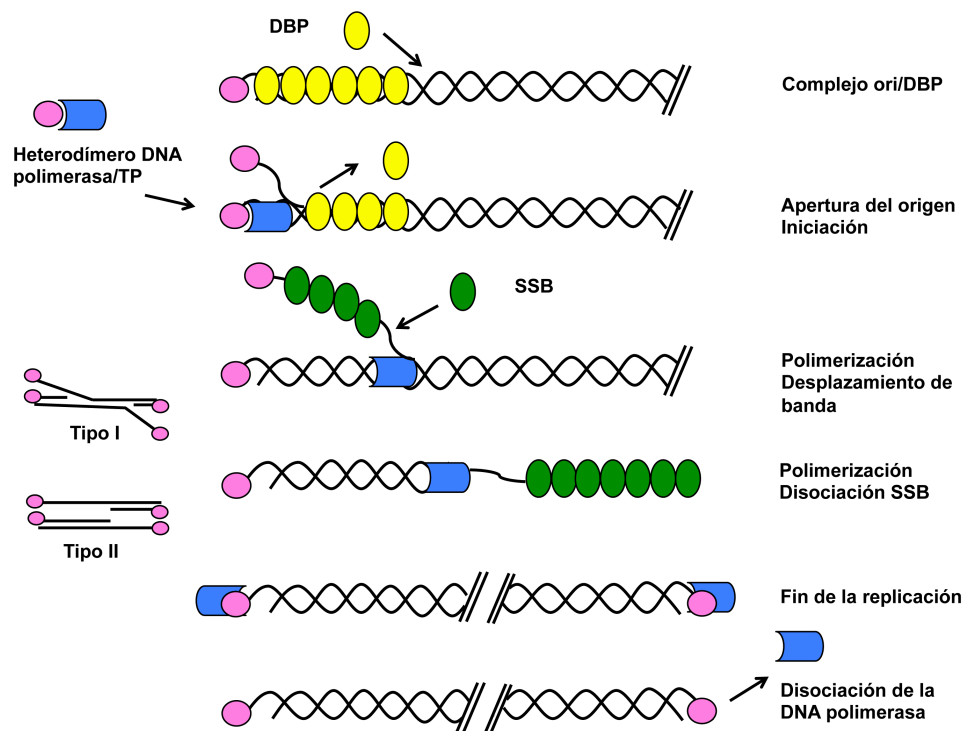


Figura 6: Representación esquemática de la replicación del genoma de $\phi 29$. Modelo de la replicación del origen izquierdo de $\phi 29$. La TP está representada en rosa, la DNA polimerasa en azul, la DBP en amarillo y la SSB en verde.

El heterodímero DNA polimerasa/TP se disocia después de la incorporación de diez nucleótidos definiéndose una etapa de transición entre la iniciación con TP y la elongación con DNA (Méndez *et al.*, 1997). Después, la misma DNA polimerasa continúa con la elongación de manera procesiva, sin disociarse del DNA, y acoplando la polimerización al desplazamiento de la cadena que no se utiliza como molde (desplazamiento de banda) sin necesidad de helicasas ni factores de procesividad, al contrario de lo que ocurre en el caso de la mayoría de replicasas (Blanco *et al.*, 1989; Blanco y Salas, 1985b). Según avanza la replicación, la banda desplazada que se va originando es cubierta por la proteína p5 (Martín *et al.*, 1989), que la protege de la acción de nucleasas (Martín *et al.*, 1989) y evita la formación de estructuras secundarias en el DNA que dificulten el avance de la DNA polimerasa (Soengas *et al.*, 1995).

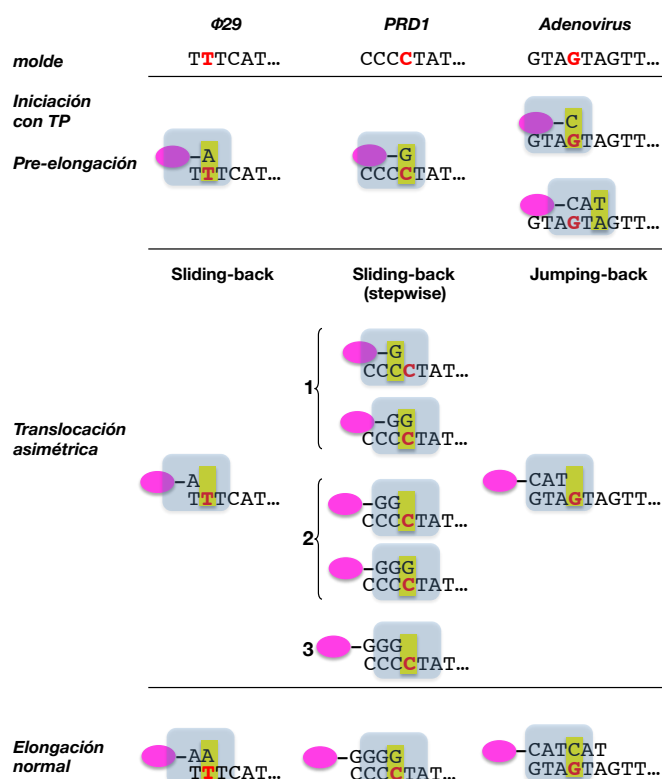


Figura 7: Mecanismos de *sliding-back*. En la figura aparecen representados el mecanismo de *sliding-back* de $\phi 29$, el *stepwise sliding-back* de PRD1 y el *jumping-back* de adenovirus. Para más información consultar el texto principal. La TP está representada en rosa en los tres casos. El nucleótido de la cadena iniciadora usado como molde se ha representado en rojo. (Adaptado de de Vega y Salas, 2012).

Este mecanismo de replicación ocurre en ambos extremos del genoma de manera no simultánea generando intermedios replicativos de tipo I (Harding e Ito, 1980; Inciarte *et al.*, 1980; Sogo *et al.*, 1982). Estos intermedios replicativos de tipo I consisten en moléculas de DNA de doble cadena con una o más colas de DNA de cadena sencilla protegidas por la proteína SSB (Gutiérrez *et al.*, 1991). Cuando las dos horquillas de replicación que se han iniciado en ambos extremos del genoma se encuentran, las cadenas paternas se separan dando lugar a intermedios replicativos tipo II (Inciarte *et al.*, 1980; Sogo *et al.*, 1982). La elongación en estas moléculas ocurre sin desplazamiento de banda, con la disociación de la SSB según avanza la replicación. Una vez que la polimerasa alcanza el extremo opuesto tiene lugar su

disociación del DNA, y por tanto la terminación de la replicación, dando lugar a dos moléculas de DNA de $\phi 29$.

Algunos virus eucariotas como adenovirus y poliovirus, así como los bacteriófagos PRD1 (Caldentey *et al.*, 1993; Caldentey *et al.*, 1992), Cp-1 (Martín *et al.*, 1996), GA-1 (Illana *et al.*, 1996; Longás *et al.*, 2006) y Nf (González-Huici *et al.*, 1996; Longás *et al.*, 2006) utilizan un mecanismo de replicación de su DNA similar, utilizando también una TP como iniciadora. Estudios previos realizados con $\phi 29$, Nf y GA-1 mostraron que a pesar de la homología existente entre las proteínas de estos fagos con las de $\phi 29$, existe un alto grado de especificidad de las interacciones entre la DNA polimerasa, la TP y los orígenes de replicación (González-Huici *et al.*, 2000a).

En el caso de GA-1, la reacción de iniciación está dirigida por el segundo nucleótido en 3' de la cadena molde, como en $\phi 29$, y mediante un mecanismo de *sliding-back* se recupera la información del nucleótido en 3', por lo que se requiere que la primera y la segunda posición del molde contengan la misma base (Illana *et al.*, 1996). Sin embargo, virus como Nf o Cp-1 inician usando como molde el tercer nucleótido en 3' (Longás *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 1996) y PRD1 el cuarto (Caldentey *et al.*, 1993). En estos casos, se requiere que las posiciones anteriores a la base utilizada como molde sean iguales a esta, y después se recuperan mediante sucesivas rondas de *sliding-back* en un proceso denominado *stepwise sliding-back* (Figura 7). En adenovirus, se ha descrito que la iniciación de la replicación está dirigida por la cuarta posición del molde, siendo su secuencia en los extremos 3' GTAGTA (no hay una repetición de los cuatro primeros nucleótidos); el heterodímero DNA polimerasa/TP sintetiza el triplete CAT tomando como molde los nucleótidos del 4 al 6, posteriormente se desplaza hacia atrás en un mecanismo denominado *jumping-back* a las posiciones complementarias 1-3 del extremo 3', y después se produce la elongación (King y van der Vliet, 1994) (Figura 7).

3.2. La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$

La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ es el producto del gen viral 2, posee 572 aminoácidos y un peso molecular de 66 kDa. Se ha caracterizado como la polimerasa encargada de la replicación del DNA viral (Blanco y Salas, 1985b). Pertenece a la familia B (tipo eucariota) de las DNA polimerasas dependientes de DNA (Bernad *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1986). Como el resto de polimerasas presenta actividad de polimerización, con unos valores de discriminación en la inserción del nucleótido de 10^4 - 10^6 , y con una eficiencia de elongación de desapareamientos de 10^5 - 10^6 veces menor que la de un extremo correctamente apareado (Esteban *et al.*, 1993). Tiene capacidad para llevar a cabo la iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$ utilizando la TP como iniciador y la posterior elongación del DNA, hasta completar la replicación del genoma (Blanco *et al.*, 1989; Blanco y Salas, 1985b). Además,

posee dos características específicas que la distinguen del resto de DNA polimerasas: su elevada procesividad (>70 kb) y la capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda. Estas propiedades permiten al enzima la replicación del genoma completo a partir de un único evento de asociación al DNA sin la necesidad de ningún factor de procesividad y sin la intervención de proteínas tipo helicasas (Blanco *et al.*, 1989).

La DNA polimerasa de $\phi 29$ también cataliza dos reacciones degradativas: la pirofosforólisis y la exonucleólisis 3'-5'. La pirofosforólisis es la inversa a la replicación. Consiste en la liberación de dNTPs del extremo 3' de una estructura molde/iniciador como consecuencia de la adición de PPi en presencia de iones divalentes, posiblemente jugando un papel en la fidelidad (Blasco *et al.*, 1991) como se ha demostrado para otras DNA polimerasas como Pol λ (Crespan *et al.*, 2012). Los mutantes de la DNA polimerasa en los residuos catalíticos de polimerización están también afectados en la pirofosforólisis indicando que ambas actividades se encuentran en el mismo centro activo (Blasco *et al.*, 1991). La actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores se encuentra en la misma cadena polipeptídica que la actividad de polimerización, aunque como en la mayoría de las replicasas las actividades de polimerización y exonucleólisis de la DNA polimerasa de $\phi 29$ están presentes en dominios estructuralmente independientes (Blanco y Salas, 1995; Kamtekar *et al.*, 2004). Esta actividad requiere iones divalentes para liberar dNMPs del extremo 3' de una cadena de DNA (Blanco y Salas, 1985a) y juega un papel importante en la fidelidad ya que corrige errores incorporados durante la replicación del DNA, degradando preferentemente extremos desapareados frente a extremos apareados (Garmendia *et al.*, 1992). Esta actividad degrada procesivamente (sin disociarse del DNA) sustratos mayores de 6 nucleótidos con una constante catalítica de 500 s^{-1} y distributivamente sustratos de menor longitud (Esteban *et al.*, 1994).

3.3. Estructura de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$

La resolución de la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar *et al.*, 2004) mostró un plegamiento bimodular similar al encontrado en otras DNA polimerasas de la familia B (Wang *et al.*, 1997) con un dominio N-terminal (residuos 1-189) y un dominio C-terminal (residuos 190-575), tal y como se muestra en la Figura 8.

En el dominio **N-terminal** se encuentra la actividad exonucleasa 3'-5' (Blanco y Salas, 1995) responsable de la actividad correctora de errores (Bernad *et al.*, 1989). Presenta tres motivos de secuencia conservados universalmente: Exo I, Exo II y Exo III, que contienen los residuos carboxílicos encargados de la unión de los dos iones metálicos responsables de la actividad exonucleasa 3'-5': Asp12 y Glu14 (Exo I), Asp 66 (Exo II) y Asp169 (ExoIII), así como la Tyr165 (Exo III) implicada en la correcta orientación del grupo hidroxilo durante el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster (Bernad *et al.*, 1989; Blanco *et al.*, 1991; Soengas *et*

al., 1992). Entre los motivos ExoII y ExoIII se localiza el motivo Kx₂h, donde se encuentra la Lys143 que desempeña un papel auxiliar en la catálisis de la reacción exonucleasa (de Vega *et al.*, 1997) y el motivo (S/T)Lx₂h cuyos residuos Ser122 y Leu123 están involucrados en la unión del DNA y de la TP (de Vega *et al.*, 1998a; de Vega *et al.*, 1998b; Rodríguez *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004). También se han identificados residuos que interaccionan con el DNA de banda simple en el centro activo de exonucleolisis como la Thr15 (ExoI), Asn62 y Phe65 (ExoII), Tyr148 (Kx₂h) (de Vega *et al.*, 1998a; de Vega *et al.*, 1996; de Vega *et al.*, 1998b; Pérez-Arnaiz *et al.*, 2009). Además, la resolución de la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa unida a un oligonucleótido de 5mer (Kamtekar *et al.*, 2004) no solo permitió confirmar el papel de los residuos anteriormente mencionados, sino también la identificación de otros como la Leu567 del subdominio *thumb*, que tiene un papel en la estabilización del DNA en el centro activo exonucleasa (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2006).

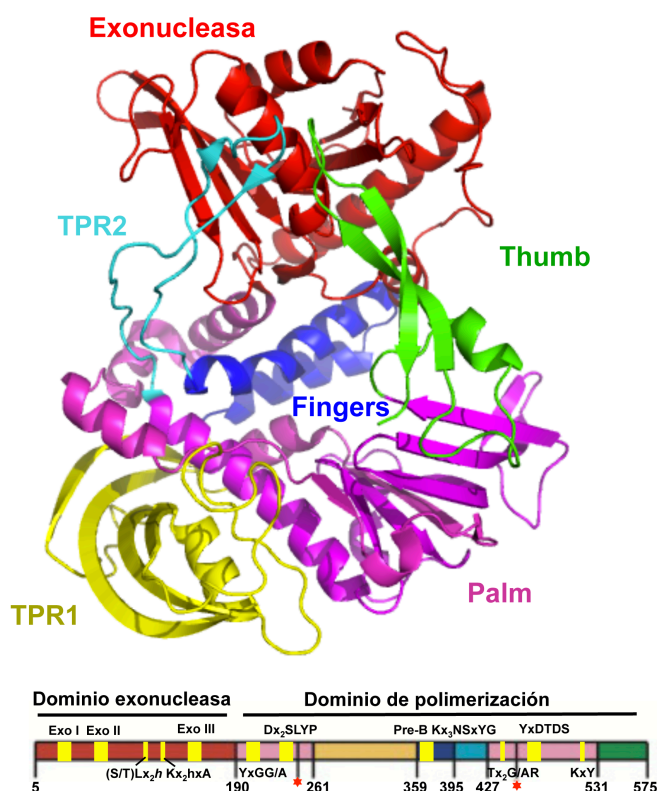


Figura 8: Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$. El dominio exonucleasa se representa en rojo, el *thumb* en verde, el *palm* en rosa, los *fingers* en azul oscuro y los subdominios TPR1 y TPR2 en amarillo y azul claro respectivamente, como aparecen representados en Kamtekar *et al.* (2004). En la parte inferior se muestra la estructura primaria de la DNA polimerasa con los distintos dominios y subdominios, así como los motivos conservados. La figura se ha hecho con el software Pymol (<http://www.pymol.org>). Los datos cristalográficos corresponden al PDB 2EX3.

En el dominio **C-terminal** se localizan las actividades de síntesis, iniciación con TP, polimerización del DNA y la pirofosforólisis. Contiene los residuos implicados en la unión de los sustratos de la DNA polimerasa: el DNA, los dNTPs y la TP (Berman *et al.*, 2007; Blanco y Salas, 1996; Kamtekar *et al.*, 2004; Kamtekar *et al.*, 2006). Tiene una estructura similar a una mano derecha semi-abierta con los dominios universales *palm*, *thumb* y *fingers*.

El subdominio *palm* contiene los aminoácidos encargados de coordinar los metales catalíticos Asp249 (motivo A) y Asp458 (motivo C) (Berman *et al.*, 2007), así como un tercer residuo implicado en esta coordinación, la Val 250 (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2010). Se ha propuesto

un papel para el Glu486 del motivo LEXE en la coordinación del tercer metal catalítico en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de ϕ 29 (Santos *et al.*, 2014).

El subdominio *fingers*, al igual que en otras DNA polimerasas de la familia B, está formado por dos hélices antiparalelas. En él se localizan los motivos Pre-B y B que contienen los residuos responsables de la interacción con el dNTP entrante y con la cadena molde (Blanco y Salas, 1996; Blasco *et al.*, 1992; Blasco *et al.*, 1993; Saturno *et al.*, 1997; Truniger *et al.*, 2002; Truniger *et al.*, 2004). En ausencia de dNTP se encuentra en conformación abierta, pero unido a dNTP rota hacia el subdominio *palm* adoptando una conformación cerrada y constituyendo el centro activo donde el nucleótido entrante se aparea a la base complementaria de la cadena molde (Berman *et al.*, 2007). En este subdominio se han identificado dos tirosinas cuyo movimiento se ha propuesto como responsable de la translocación de la DNA polimerasa a lo largo del DNA: Tyr390 (motivo B) y Tyr254 (motivo A). Estas tirosinas cambian su posición pasando de ocupar el sitio de inserción del dNTP en el complejo binario a abandonarlo tras la rotación del subdominio *fingers*, formando así parte del bolsillo hidrofóbico que va a alojar el par de bases naciente en el complejo ternario, permitiendo el alojamiento del dNTP entrante (Berman *et al.*, 2007). Además, la Tyr 254 es la encargada de discriminar contra el grupo 2'-OH de los ribonucleótidos (Bonnin *et al.*, 1999). También se han identificado el papel de la Lys538 (motivo B) y Lys537 (motivo Pre-B) en la interacción con los fosfatos del dNTP entrante y en la estabilización del complejo (Berman *et al.*, 2007).

El subdominio *thumb* es pequeño, formado por un *loop* seguido por un conector que contiene una pequeña α hélice, y finaliza en un elemento β -turn- β que queda enfrente a la región TPR2 (Kamtekar *et al.*, 2004). En este subdominio se encuentran residuos positivos encargados de la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, así como en la coordinación de las actividades de polimerización y exonucleólisis (Kamtekar *et al.*, 2004; Pérez-Arnaiz *et al.*, 2006).

La DNA polimerasa de ϕ 29 presenta, a diferencia de otras polimerasas de la familia B, dos inserciones específicas conservadas en las DNA polimerasas que inician la replicación de sus genomas con TP, llamados *Terminal Protein Region 1* y 2 (TPR1 y TPR2) (Blasco *et al.*, 1990; Dufour *et al.*, 2000). El subdominio **TPR1** está localizado entre el *palm* y el *fingers*. En la resolución de la estructura cristalográfica se ha visto que interacciona con el dsDNA (DNA de banda doble) y con la TP (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2004) tal y como se había propuesto previamente (Dufour *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003). El subdominio **TPR2** tiene una estructura en forma de *loop* β -turn- β , localizado frente al subdominio *thumb*. Forma junto a los subdominios *thumb*, *palm* y TPR1 una estructura anular que rodearía por completo al DNA *upstream*, estabilizando la unión de la DNA polimerasa al sustrato requerido para llevar a cabo la replicación de manera procesiva (Berman *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005). Además, el

subdominio TPR2, junto con los subdominios *fingers* y *palm* y el dominio exonucleasa forma un canal estrecho por el que pasa la cadena molde para acceder al centro activo de polimerización durante la replicación, y donde sólo puede alojarse DNA de cadena sencilla debido a sus dimensiones. Esto hace necesaria la separación previa de las dos cadenas del dsDNA (Kamtekar *et al.*, 2004), actuando el TPR2 a modo de “cuña” entre ambas hebras y proporcionando a la polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005).

3.4. Estructura del heterodímero DNA polimerasa/TP del bacteriófago $\phi 29$

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la TP (Kamtekar *et al.*, 2006) muestra como la TP está estructurada en tres dominios (Figura 9):

El **dominio N-terminal** (residuos 1-73) está desestructurado en los cristales y no parece que pueda interaccionar con la DNA polimerasa. Estudios recientes realizados mediante programas de predicción de estructura secundaria proponen la existencia de dos regiones de hélices- α conectadas a través de un *loop*, siendo estos datos consistentes con los resultados obtenidos experimentalmente por dicroísmo circular donde se revela un contenido helicoidal de aproximadamente un 60% en este dominio (Holguera *et al.*, 2014). Este dominio es el responsable de la localización de la TP en el nucleóide bacteriano gracias a su capacidad de unión al DNA independiente de secuencia, y es necesario para una replicación eficiente *in vivo* del DNA viral (Muñoz-Espín *et al.*, 2010).

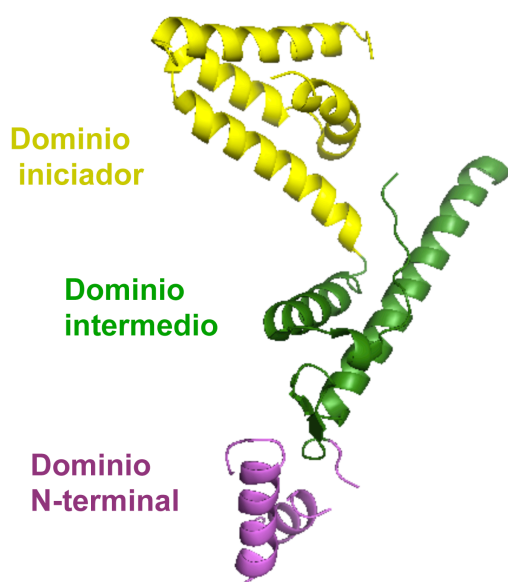


Figura 9: Estructura tridimensional de la TP de $\phi 29$. La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP mostró como la TP está estructurada en tres dominios. El dominio iniciador se representa en amarillo, el dominio intermedio en verde y el N-terminal en violeta. La figura se ha hecho con el software Pymol (<http://www.pymol.org>). Los datos cristalográficos corresponden al PDB 2EX3.

El **dominio intermedio** (residuos 74-172) está formado por dos hélices- α y una estructura β -giro- β . Está conectado a través de un *loop* flexible que actúa como bisagra con el

dominio iniciador. Tiene carácter electropositivo y el reconocimiento específico entre la DNA polimerasa y la TP se debe principalmente a la interacción entre el TPR1 de la DNA polimerasa y dominio intermedio de la TP (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007).

El **dominio iniciador** o C-terminal (residuos 173-266) está formado por cuatro hélices α . En él se encuentra el residuo iniciador, la Ser232, que proporciona el grupo hidroxilo necesario para que la DNA polimerasa inicie la síntesis del DNA. Esta serina está en el *priming-loop*, al final del dominio iniciador entre las dos últimas hélices α , y en la estructura cristalográfica adopta una conformación desordenada. Cuando la TP forma un heterodímero con la DNA polimerasa, la Ser232 se situaría en el centro activo de polimerización de la misma. Presenta un carácter electronegativo y contacta con los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa.

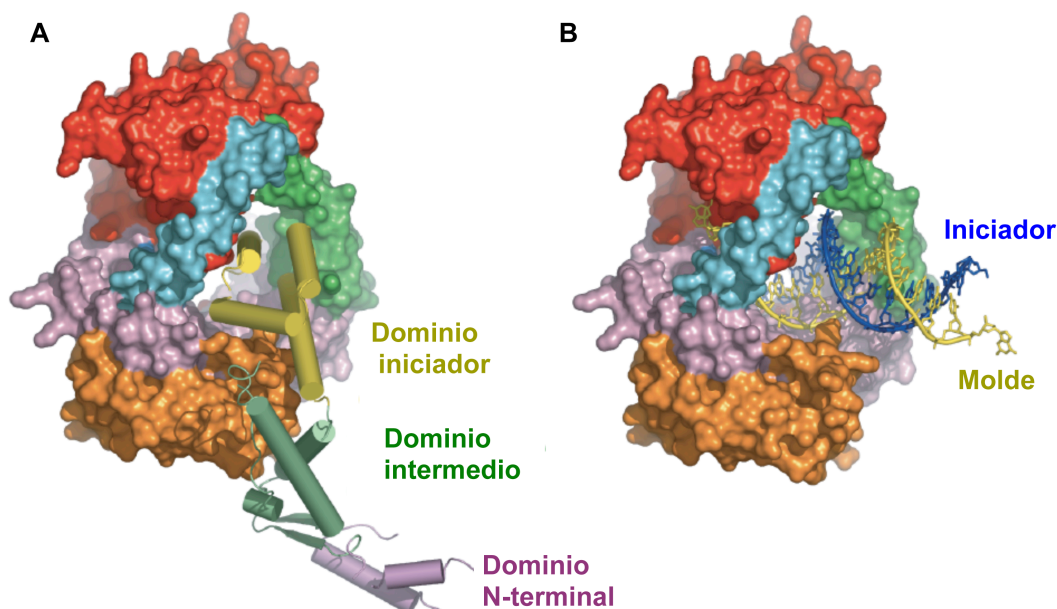


Figura 10: Estructura tridimensional del heterodímero DNA polimerasa/ TP y DNA polimerasa/DNA. (A) Representación del heterodímero DNA polimerasa/TP. (B) Modelado de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con DNA. Los distintos dominios de la DNA polimerasa se representan como en la **Figura 9**. En la TP el dominio iniciador aparece en amarillo, el dominio intermedio en verde y el dominio N-terminal en violeta. El dominio iniciador de la TP se une a la DNA polimerasa de una manera análoga a como lo hace el DNA con estructura molde/iniciador. (Adaptado de Kamtekar *et al.*, 2006).

Mientras que el dominio iniciador se mueve en respuesta a la translocación del DNA después de la incorporación del nucleótido, el dominio intermedio sería el principal contribuyente a la estabilización del complejo DNA polimerasa/TP, manteniéndose en una orientación fija durante toda la etapa de la transición. La rotación del dominio iniciador con respecto al dominio intermedio sería permitida gracias a la flexibilidad del *loop* que conecta ambos dominios. Después de la incorporación de 6-7 nucleótidos, la tensión de torsión acumulada en la región flexible, así como la proximidad de la serina iniciadora de la TP a dicho

loop impediría la continuación de la rotación produciéndose la disociación del heterodímero (Kamtekar *et al.*, 2006).

Comparando la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa unida a la TP y unida al DNA, se observa que el dominio iniciador de la TP ocupa el mismo lugar que el dúplex de DNA (ver Figura 10), lo que sugiere que la TP mimetiza al DNA en sus interacciones con la DNA polimerasa. Esto explica la incapacidad de la polimerasa para iniciar en regiones internas del DNA, ya que la TP bloquea casi completamente el túnel de unión del DNA (Kamtekar *et al.*, 2006).

3.5. Papel de la TP del bacteriófago $\phi 29$ *in vivo*

In vivo, la TP de $\phi 29$ se asocia con el nucleóide bacteriano independientemente de otras proteínas codificadas por el fago. Recluta a la DNA polimerasa viral al nucleóide bacteriano en la infección temprana y después ambas proteínas se relocalizan en estructuras helicoidales periféricas en un proceso dependiente del citoesqueleto bacteriano (Muñoz-Espín *et al.*, 2010).

Estudios recientes han predicho la existencia de una señal de localización nuclear (NLS) en los residuos del 1 al 37 del dominio N-terminal de la TP, que permite a ésta localizarse en el núcleo de células de mamífero (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012). También se ha predicho la existencia de NLS en la TP de otros bacteriófagos como Nf, PRD1, Bam35 y Cp-1, proponiéndose un posible papel de los genomas virales que contienen unida covalentemente una TP con una NLS como vectores de transferencia génica horizontal (HGT) entre bacterias y el núcleo eucariota. Además, la existencia de estas NLS en TPs podría aprovecharse como herramienta para estimular el paso de translocación nuclear de genes en células de mamífero (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012; Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Objetivos

- 1- Estudio de la implicación de los residuos Arg158, Arg169, Glu191, Asp198, Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 de la TP de ϕ 29 en la formación de un heterodímero estable y funcional con la DNA polimerasa mediante la caracterización bioquímica de mutantes puntuales en dichas posiciones.
- 2- Análisis del papel de la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA.
- 3- Estudio de la posible interacción de la Lys529 de la DNA polimerasa con el Glu233 de la TP de ϕ 29.
- 4- Influencia de la TP parental en el reconocimiento del nucleótido usado como molde en la reacción de iniciación.
- 5- Análisis de la implicación de las hélices del dominio iniciador de la TP de ϕ 29 en dictar el nucleótido usado como molde en la reacción de iniciación, mediante la caracterización de quimeras de la TP de ϕ 29 en la que se cambian estas hélices por las correspondientes del fago Nf.
- 6- Influencia de la posición de los residuos aromáticos del *priming-loop* de la TP en dictar la posición del nucleótido usado como molde en la reacción de iniciación, mediante análisis bioquímicos de mutantes del *priming-loop* de la TP de ϕ 29, en los que se modifica la posición del residuo aromático con respecto al residuo iniciador.
- 7- Estudio de la implicación de la primera hélice α del dominio intermedio de la TP en el reconocimiento del origen de replicación, mediante la caracterización de quimeras de la TP de ϕ 29 y de los fagos relacionados Nf y GA-1.
- 8- Análisis del papel del dominio N-terminal de la TP en el reconocimiento del origen de replicación mediante el intercambio de dicho dominio entre las TPs de los fagos ϕ 29 y Nf.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Nucleótidos

Los nucleótidos no marcados radiactivamente fueron obtenidos de Amersham Pharmacia. [α - 32 P] dATP (3000 Ci/mmol), [α - 32 P] dTTP (3000 Ci/mmol) y [γ - 32 P] ATP (3000 Ci/mmol) fueron suministrados por Perkin Elmer.

El compuesto 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina monofosfato (*p*NP-TMP) fue comprado a Sigma.

1.2. Proteínas

La DNA polimerasa *wild-type* del bacteriófago ϕ 29 se purificó a partir de células *E. coli* BL21(DE3) que portaban el plásmido pJLPM (derivado de pT7-4w2), como se describe en Lázaro *et al.* (1995). Los mutantes de la DNA polimerasa de ϕ 29 que aparecen en esta memoria, así como el mutante N62D de la DNA polimerasa (de Vega *et al.*, 1996) y el mutante deficiente en actividad exonucleasa (D12A/D66A) (Bernad *et al.*, 1989) se purificaron básicamente como se describe para la DNA polimerasa *wild-type*, a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban los diferentes plásmidos recombinantes. Las DNA polimerasas de los fagos Nf y GA-1 se purificaron como se describe en González-Huici *et al.* (2000b) y Lázaro *et al.* (1995).

La proteína terminal del bacteriófago ϕ 29 se purificó a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) como se describe en Mencía *et al.* (2011). Los mutantes y quimeras de la TP de ϕ 29 que aparecen en esta memoria se purificaron básicamente como se describe para la TP *wild-type*, a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban los diferentes plásmidos recombinantes. Las quimeras Phi29Nf, NfPhi29, Phi29GA-1 y GA-1Phi29, así como las TP *wild-type* de ϕ 29, Nf y GA-1 utilizadas en los ensayos, se purificaron de la fracción insoluble como se describe en Zaballos *et al.* (1989).

La SSB (p5) y la DBP (p6) se obtuvieron a partir de células de *B. subtilis* infectadas con el bacteriófago ϕ 29 y se purificaron como se describe en Martín *et al.* (1989) y Mencía *et al.* (2011), respectivamente.

1.3. Sustratos de DNA y oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sp1 y sp1c+6 (ver Tabla I) fueron comprados a Isogen, y el 30mer y el 36mer a Invitrogen y se utilizaron para construir los sustratos con estructura molde/iniciador. Los oligonucleótidos sp1 y 30mer fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P] ATP utilizando la polinucleótido quinasa del fago T4 (New England Biolabs) y posteriormente hibridados con sp1c+6 y 36mer, respectivamente, en presencia de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2 M NaCl.

Los oligonucleótidos de banda simple con la secuencia correspondiente a la cadena molde del extremo derecho del genoma del bacteriófago $\phi 29$ y sus variantes en las tres primeras bases del extremo 3' fueron obtenidos de Invitrogen. Para su nomenclatura se ha utilizado un código de tres símbolos en los que la primera letra corresponde al nucleótido que es sustituido, el número entre las dos letras indica la posición de este nucleótido con respecto del extremo 3' y la segunda letra corresponde al nucleótido por el que es sustituido. Los oligonucleótidos de banda simple con la secuencia de la cadena molde del extremo derecho del genoma de los bacteriófagos Nf y GA-1 también se obtuvieron de Invitrogen. Todos los oligonucleótidos fueron purificados electroforéticamente en geles 20% poliacrilamida-8 M urea.

El genoma del bacteriófago $\phi 29$ (TP-DNA) fue obtenido como se describe en Peñalva y Salas (1982). De manera análoga se obtuvieron los TP-DNA de los fagos Nf y GA-1.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados durante el transcurso de esta Tesis. En azul se indican aquellos nucleótidos utilizados como sustrato de las actividades enzimáticas de las DNA polimerasas de $\phi 29$, Nf y GA-1. En negro los utilizados para el clonaje de los mutantes y quimeras de la TP, así como para los mutantes de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Todos los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen excepto spl y splc+6 que se compraron a Isogen.

OLIGO	SECUENCIA
sp1	5' GATCACAGTGAGTAC
sp1c+6	5' TCTATTGTACTCACTGTGATC
sp1c+14A	5' ACTGGCCGTCGTTAGTACTCACTGTGATC
4mer	5' GATC
5mer	5' GATCA
30mer	5' AACTGCCAAGAATAGTGTGTCAGTTCCAGACG
36mer	5' TCTATTTCGTCTCCAAGTACACTATTCTTGGCAGTT
TTT	5' TGGTGTATGTTGTCGCTGTACCCTACTTT
T1A	5' TGGTGTATGTTGTCGCTGTACCCTACTTA
T2A	5' TGGTGTATGTTGTCGCTGTACCCTACTAT
T3A	5' TGGTGTATGTTGTCGCTGTACCCTACATT
TTT(Nf)	5' TGGGTCGATTTTGCTTTGAACCTTACTTT
TTT(GA-1)	5' GCGAACGCTTGTTTCATGGGGAATCTATTT
Primer universal	5' GTTTTCCCAGTCACGAC
R158AF	5' GGTGCGAAGCTATAGCGCTTTGCGAACCCCTAGAAG
R158AR	5' CTTCTAGGGTTTCGCAAAGCGCTATAGCTTTCGCACC
R169AR	5' GAAAGCATGGAGATGGCAACAGACCCTCAGTATTATG
R169AF	5' CATAATACTGAGGGTCTGTTGCCATCTCCATGCTTTTC
E191AF	5' CTTTATTAAGCGTTGCGGGTAGTTTCAATTCATTTG
E191AR	5' CAAATGAATTGAAACTACCCGCAACGCTTAATAAAG
D198AR	5' GGTAGTTTCAATTCATTTGCTGCGGCAGATGAACTG
D198AF	5' CAGTTCATCTGCCGCAGCAAATGAATTGAAACTACC
Y250AF	5' GTATATAAAATACTGTCAGCCTTGGAACAGTATCGAAGG
Y250AR	5' CCTTCGATACTGTTCCAAGGCTGACAGTATTTTATATAC
E252AF	5' GTATATAAAATACTGTCATACTTGGCACAGTATCGAAGGGGTG
E252AR	5' CACCCCTTCGATACTGTGCCAAGTATGACAGTATTTTATATAC
Q253AF	5' CTGTCATACTTGGAAGCGTATCGAAGGGGTGAC

Q253AR	5' GTCACCCCTTCGATACGCTTCCAAGTATGACAG
R256AF	5' CTTGGAACAGTATCGAGCGGGTGACTTTGATCTAAGC
R256AR	5' GCTTAGATCAAAGTCACCCGCTCGATACTGTTCCAAG
K529AF	5' CACTGATATAAAATTTAGTGTTGCATGTGCGGGAATGACTG
K529AR	5' CAGTCATTCCCGCACATGCAACACTAAATTTTATATCAGTG
K529EF	5' CACTGATATAAAATTTAGTGTTGAATGTGCGGGAATGACTG
K529ER	5' CAGTCATTCCCGCACATTCAACACTAAATTTTATATCAGTG
E233KF	5' CCTTTGAGGAATTTGATAGTAAGGGAAACACAGTGGAACG
E233KR	5' CGTCTCCACTGTGTTTCCCTTACTATCAAATTCCTCAAAGG
Phi29NfH1F	5' CCCTCAGTATTATGAAAAGAAAATGATACAGTTACAGTTAACTTTA TTGAAATAGTTGAAAAAAGTTTCAATTCATTTGATGCGGC
Phi29NfH1R	5' GCCGCATCAAATGAATTGAAACTTTTTTCAACTATTTCAATAAAGTT TAACTGTAAGTGTATCATTTTCTTTTCATAATACTGAGGG
Phi29NfH3F	5' CGAAGAATTAAAAAAGATACCTCCTGATGATTTTTTTGAATTATATC TCATGTTTGATGAAATATCCTTTGAGGAATTTGATAGTGAGGGAAACAC AG
Phi29NfH3R	5' CTGTGTTTCCCTCACTATCAAATTCCTCAAAGGATATTTTCATCAAAC ATGAGATATAATTCAAAAAAATCATCAGGAGGTATCTTTTTTAATTCTT CG
Phi29NfH4F	5' GGGAGTGAGGGAGAGGATGTGGAGGCATCGGAAGCTATGTTGAATAA AATACATTCATACTTGAAGGG
Phi29NfH4R	5' CCCTTCCAAGTATGAATGTATTTTATTCAACATAGCTTCCGATGCCT CCACATCCTCTCCCTCACTCCC
E229YF	5' GAAATATCCTTTTGAGTATTTTGATAGTGAGGGA
E229YR	5' TCCCTCACTATCAAAATACTCAAAGGATATTTTC
E228F/F230VF	5' GAAATATCCTTTTTTGAAGTGGATAGTGAGGGA
E228F/F230VR	5' TCCCTCACTATCCACTTCAAAAAAGGATATTTTC
Phi29NfF1	5' CGAAAAGAATGCATACGGTGTGGTGGCTAGTAAAGCGAAAATTAATG AGATTGCGAAGAACACAAAAGAGGTTTCAAGCGGTTAGTAGATGAG
Phi29NfR1	5' CTCATCTACTAACCCTGAACCTCTTTTGTGTTCTTCGCAATCTCAT TAATTTTCGCTTTTACTAGCCACCACACCGTATGCATTCTTTTCG
Phi29NfF2	5' GCGAAAATTAATGAGATTGCGAAGAACACAAAAGAAGCCCAAAGAAT CGTTGATGAACAGAGGAAGGCTATGAAAGACAAAAGAATACTATGCAGGC GG
Phi29NfR2	5' CCGCCTGCATAGTATTCTTTGTCTTTTCATAGCCTTCTCTGTTTCATC AACGATTCTTTGGGCTTCTTTTGTGTTCTTCGCAATCTCATTAATTTTC GC
Phi29GA-1F1	5' GCGTTATCAGTTCGAAAAGAATGCATACGGTGTGGTGGCTTCTAAAA CTGAATTAGATGAAATTCTGTCTGACAAAGAGGTTTCAAGCGGTTAGTAGA TGAG
Phi29GA-1R1	5' CTCATCTACTAACCCTGAACCTCTTTGTGTCAGACAGAATTTTCATCTA ATTCAGTTTTAGAACCCACCACACCGTATGCATTCTTTTCGAACTGATA ACGC
Phi29GA-1F2	5' GGCTTCTAAAACTGAATTAGATGAAATTCTGTCTGACACAAAGAAAG CTCAAGAAGTTGCGGAAAAAATAAAGGCTATGAAAGACAAAGAATACTA TGC
Phi29GA-1R2	5' GCATAGTATTCTTTGTCTTTTCATAGCCTTTATTTTTTCCGCAACTTC TTGAGCTTTCTTTGTGTCAGACAGAATTTTCATCTAATTCAGTTTGTAGAA GCC
NfPhi29F1	5' CAGTTTGTTAAAAATAAATATGGAATTGTGGCTAGTAAAGCTAAGAT AGCTGAGATTGAACGTAACACAAAAGAAGCCCAAAGAATCGTTGATGAA CAG
NfPhi29R1	5' CTGTTTCATCAACGATTCTTTGGGCTTCTTTTGTGTTACGTTCAATCT CAGCTATCTTAGCTTTACTAGCCACAATTCCATATTTATTTTAACAAA CTG

NfPhi29F2	5 ' GCTAAGATAGCTGAGATTGAACGTAACACAAAAGAGGTTTCAGCGGTT AGTAGATGAGAAAATCGAAGAAATAGAGGACAAGCCTTTTATCTCTGGT GG
NfPhi29R2	5 ' CCACCAGAGATAAAAAGGCTTGTCCTCTATTTCTTCGATTTTCTCATC TACTAACCGCTGAACCTCTTTTGTGTTACGTTCAATCTCAGCTATCTTA GC
GA-1Phi29F1	5 ' GGACTTTCAATTTCGTTAAAAATGAATATGGTGTTGTAGTGAGTAAAG CTAAGATAGCTGAGATTGAACGTAACACAAAAGAAAGCTCAAGAAGT TGCG
GA-1Phi29R1	5 ' CGCAACTTCTTGAGCTTTCTTTGTTGTGTTACGTTCAATCTCAGCTA TCTTAGCTTTACTCACTACAACACCATATTCATTTTTTAACGAATTGAAA GTCC
GA-1Phi29F2	5 ' GCTAAGATAGCTGAGATTGAACGTAACACAAAAGAGGTTTCAGCGGTT AGTAGATGAGAAAATCCTAGATAGATTTAACGACGTTGAGGTAATTTCA GGAG
GA-1Phi29R2	5 ' CTCCTGAAATTACCTCAACGTCGTTAAATCTATCTAGGATTTTCTCA TCTACTAACCGCTGAACCTCTTTTGTGTTACGTTCAATCTCAGCTATCT TAGC
Primer 1	5 ' CGCGGAATTCTGAAAGGAGATAACG
Primer 2	5 ' TTTATTTTTTAACAACTGATAATTCATATTAGCACGGTTAGTGAAAG A
Primer 3	5 ' CGCGGAATTTCGTTAAAGGGGGTGA
Primer 4	5 ' TGCATTCTTTTCGAACTGATAACGTTGATTAGCACGATTCGTAAATG A
Primer 5	5 ' CGTTATCAGTTTCGAAAAGAATGCA
Primer 6	5 ' CGCGGGATCCGGAGCCTAGAACC
Primer 7	5 ' AATTATCAGTTTGTAAAAATAAA
Primer 8	5 ' CGCGGGATCCGTGCTTTAAACCC

2. MÉTODOS

2.1. Mutagénesis dirigida, expresión y purificación de mutantes puntuales y quimeras de la TP de ϕ 29

Las TP mutantes y las quimeras de ϕ 29 se obtuvieron empleando el kit de mutagénesis dirigida *QuickChange®* de Stratagene. Se utilizó como molde el plásmido pT7-3 que contiene el gen de la TP de ϕ 29 y los oligonucleótidos R158AF, R158AR, R169AF, R169AR, E191AF, E191AR, D198AF, D198AR, Y250AF, Y250AR, E252AF, E252AR, Q253AF, Q253AR, R256AF, R256AR, Phi29NfH1F, Phi29NfH1R, Phi29NfH3F, Phi29NfH3R, Phi29NfH4F, Phi29NfH4R, E233KF, E233KR, E229YF, E299YR, E228F/F230VF, E228F/F230VR. Los oligonucleótidos fueron diseñados para hibridar con las cadenas opuestas del DNA del plásmido flanqueando ambos lados de la mutación. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó la DNA polimerasa *Pfu* Turbo. Después del tratamiento con la endonucleasa *DpnI*, el DNA sintetizado se transformó en células competentes *E. coli* XL1-Blue. En el caso de las quimeras Phi29Nf, Phi29GA-1, NfPhi29 y GA-1Phi29 se obtuvieron mediante dos rondas de mutagénesis, debido a la extensión de la zona intercambiada. El molde utilizado fue también el plásmido pT7-3 que contenía en este caso, el gen de la TP de ϕ 29, Nf o GA-1, según la quimera. En la primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos: Phi29NfF1, Phi29NfR1, Phi29GA-1F1,

Phi29GA-1R1, NfPhi29F1, NfPhi29R1, GA-1Phi29F1, GA-1Phi29R1. Tras comprobar la presencia de la mutación deseada, se realizó la siguiente ronda de mutagénesis con los oligonucleótidos: Phi29NfF2, Phi29NfR2, Phi29GA-1F2, Phi29GA-1R2, NfPhi29F2, NfPhi29R2, GA-1Phi29F2, GA-1Phi29R2.

La construcción de las quimeras NNfC ϕ y N ϕ CNf se consiguió en distintos pasos. Mediante una reacción de PCR se amplificó, tanto la secuencia comprendida entre los nucleótidos 1-73 del gen que codifica la TP de ambos fagos (ϕ 29 y Nf) clonado en el vector pT7-3 (*primer 1* y *primer 2* en el caso de ϕ 29, y *primer 3* y *primer 4* en el caso de Nf, originando los fragmentos I y II, respectivamente), como la secuencia comprendida entre los nucleótidos 74-226 (*primer 5* y *primer 6* para ϕ 29 y *primer 7* y *primer 8* para Nf, originándose los fragmentos III y IV, respectivamente). Los oligonucleótidos *primer 1* y *primer 3* incorporan una diana de restricción *EcoRI* en posición 5' con respecto al gen 3, y los oligonucleótidos *primer 6* y *primer 8* incorporan una diana de restricción *BamHI* en posición 3' con respecto al gen 3. Basándonos en el solapamiento de secuencia entre el extremo 3' del fragmento I y el extremo 5' del fragmento IV, así como entre el extremo 3' del fragmento II y el extremo 5' del fragmento III, se llevó a cabo una segunda reacción de PCR utilizando como molde cantidades equimoleculares de los fragmentos I y IV, así como de los fragmentos II y III. En el primer caso (fragmentos I y IV), mediante la utilización del *primer 1* y *primer 8*, y en el segundo caso (fragmentos II y III), mediante la utilización del *primer 3* y del *primer 6*, se obtuvo un DNA cuya secuencia correspondía al dominio N-terminal de ϕ 29 y a los dominios intermedio e iniciador de Nf (quimera N ϕ CNf), y un DNA con la secuencia del dominio N-terminal de Nf y los dominio intermedio e iniciador de ϕ 29 (quimera NNfC ϕ). El DNA obtenido se digirió en ambos casos con las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI* y se clonó en el plásmido pT7-3, que había sido previamente digerido con las mismas enzimas.

La presencia de la mutación deseada, así como la ausencia de mutaciones adicionales se determinó en todos los casos mediante la secuenciación del gen completo de la TP. La expresión de los mutantes se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y la purificación se realizó de manera similar a la TP *wild-type* de forma soluble (Mencía *et al.*, 2011) o insoluble (Zaballos *et al.*, 1989).

2.2. Mutagénesis dirigida, expresión y purificación de las DNA polimerasas mutantes de ϕ 29

Los mutantes de la DNA polimerasa se obtuvieron utilizando el kit de mutagénesis dirigida *QuickChange*® de Stratagene. El molde utilizado fue el plásmido pJLPM (derivado del pT7-4w2) que contiene el gen de la DNA polimerasa de ϕ 29 o el pT7-3 que contiene el gen del mutante D12A/D66A de la polimerasa que carece de actividad exonucleasa. Los

oligonucleótidos K529AF, K529AR, K529EF y K529ER fueron diseñados para hibridar con las cadenas opuestas del plásmido en las regiones flanqueantes a la mutación. Después de la amplificación con PCR y del tratamiento con *DpnI*, el DNA obtenido se transformó en células competentes *E. coli* XL1-Blue. La presencia de la mutación deseada así como la ausencia de mutaciones adicionales se determinó mediante la secuenciación del gen completo de la DNA polimerasa.

La expresión se llevó a cabo en células *E. coli* BL21(DE3) y la purificación se completó como se describe para la DNA polimerasa *wild-type* de $\phi 29$.

2.3. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP)

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico (40 mM en el caso de la TP *wild-type* de Nf y la quimera N ϕ CNf), 0,2 μ M dATP, 1 μ Ci [α -³²P] dATP, 1,6 nM TP-DNA, 13 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 13 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante y 10 mM MgCl₂, (2 mM MnCl₂ en el caso de la TP *wild-type* de Nf y la quimera N ϕ CNf). Las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado. En el caso de las quimeras Phi29Nf, NfPhi29, Phi29GA-1, GA-1Phi29, la concentración de DNA polimerasa fue de 16 nM y la de TP *wild-type* o quimérica de 160 nM.

Cuando el molde utilizado fue un oligonucleótido de banda simple la concentración de proteínas utilizada y los tiempos de incubación de las muestras fueron mayores que los utilizados cuando se usó TP-DNA (130 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante, 60 nM del mutante de la DNA polimerasa D12A/D66A y 2 μ M del nucleótido 29mer que se indica en cada figura) y la reacción se llevó a cabo en presencia de 1 mM MnCl₂ en vez de 10 mM MgCl₂. Se incubó durante 1 hora a 12 °C. El nucleótido utilizado (tanto marcado radiactivamente como no marcado) fue dATP o dTTP, según se indica.

Cuando el molde utilizado fue el DNA reconstituido el ensayo se realizó en las mismas condiciones descritas para el TP-DNA pero en presencia de 13 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante, 13 nM de DNA polimerasa, 0,4 nM del DNA reconstituido y 1 mM MnCl₂. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 30 °C.

También se llevaron a cabo ensayos de formación del complejo TP-dAMP en ausencia de molde. En este caso la reacción se realizó en las mismas condiciones descritas para el TP-DNA pero en ausencia de éste y en presencia de 25 nM de DNA polimerasa, 25 nM de TP y 1 mM MnCl₂ durante 1,5 horas a 30 °C.

Independientemente del molde utilizado, la reacción fue detenida con 10 mM EDTA-0,1% SDS, las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50 y se analizaron por SDS-PAGE. La cuantificación se llevó a cabo mediante análisis densitométrico de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP, detectadas por autorradiografía.

2.4. Ensayo de interferencia

Con este ensayo se evaluó la eficiencia de unión a la DNA polimerasa de las TPs mutantes con respecto a la TP *wild-type*, añadiendo simultáneamente en la mezcla de incubación diferentes proporciones de TPs *wild-type* y mutantes para competir por una cantidad fija de DNA polimerasa *wild-type*. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe para el ensayo de iniciación de la replicación pero en ausencia de TP-DNA (sin molde). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico, 0,2 μ M dATP, 1 μ Ci [α -³²P] dATP, 1 mM MnCl₂, 25 nM de DNA polimerasa, 25 nM de TP *wild-type* y 25, 50, 100 y 200 nM del mutante de la TP indicado. Como control se utilizó el mutante de TP S232C que es inactivo como iniciador ya que carece del grupo OH, pero conserva intacta su capacidad para interaccionar con la DNA polimerasa (Garmendia *et al.*, 1990). En todos los casos, la incubación se llevó a cabo durante 90 minutos a 30 °C. Tras la incubación, las muestras fueron procesadas como se indica en el ensayo de iniciación de la replicación.

2.5. Ensayo de cosedimentación

La mezcla de incubación contenía en 150 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 20 mM sulfato amónico, 0,6 μ M de DNA polimerasa y 0,6 μ M de TP *wild-type* o mutante. Después de incubar las muestras 30 minutos a 4 °C se ultracentrifugaron en un gradiente de glicerol continuo 15-30% (v/v). Este gradiente de 4 ml contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM sulfato amónico, la concentración indicada de NaCl, 1 mM EDTA y 7 mM 2-mercaptoetanol y se sometió a ultracentrifugación a 4 °C durante 24 horas a 58000 rpm en un rotor Beckman TST 60.4. Posteriormente, se recogieron fracciones individuales desde la parte inferior del tubo y se analizaron por PAGE-SDS en geles de poliacrilamida del 12%. Las proteínas en el gel se tiñeron con SYPRO para identificar la fracción correspondiente al heterodímero TP/DNA polimerasa (97 kDa) y a los monómeros libres de TP (31 kDa) y DNA polimerasa (66 kDa).

2.6. Ensayo de replicación del TP-DNA

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico, 20 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci [α -³²P] dATP, 10 mM MgCl₂, 1,6 nM TP-DNA, 13 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y 13 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante. En el caso de la DNA polimerasa de Nf, la mezcla de reacción también contenía 3,5 μ M de la DBP de Nf y la concentración de sulfato amónico fue de 40 mM. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 10 minutos. La reacción fue detenida con 10 mM EDTA-0.1% SDS y las muestras se filtraron a

través de columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0.7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0,7% (McDonell *et al.*, 1977). Después de la electroforesis, la posición de la molécula unidad correspondiente al DNA de ϕ 29 se detectó por tinción con bromuro de etidio de los geles, que a continuación fueron secados y autorradiografiados.

2.7. Ensayos de transición

Los ensayos de transición se realizaron esencialmente como se describe para los ensayos de replicación del TP-DNA pero en presencia de 5 μ M dATP, dGTP y dTTP. Para el análisis de los productos de transición se utilizó la concentración de TP *wild-type* o mutante que está indicada en cada caso, así como la concentración de DNA polimerasa o el mutante indicado: D12A/D66A, que carece de actividad exonucleasa 3'-5' (Bernad *et al.*, 1989) o N62D, que tiene muy baja actividad exonucleasa pero retiene la habilidad de desplazar banda (de Vega *et al.*, 1996). Las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado y la reacción se detuvo adicionando 10 mM EDTA-0.1% SDS. Las muestras se filtraron posteriormente a través de columnas de Sephadex G-50 y se analizaron en geles del 12% PAGE-SDS (360 mm x 280 mm x 0.5 mm) para permitir la separación de los distintos productos originados, como se describe en Méndez *et al.* (1992).

2.8. Ensayos de *sliding-back*

El ensayo se llevó a cabo esencialmente en la mismas condiciones descritas para los ensayos de transición con TP-DNA pero en presencia de 5 μ M dATP y dGTP y 500 μ M ddTTP. Tras incubar durante 5 minutos a 30 °C la reacción se detuvo mediante la adición de 10 mM EDTA-0.1% SDS, y las muestras se filtraron en columnas de Sephadex G-50. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles del 12% PAGE-SDS (360 mm x 280 mm x 0.5 mm) para permitir la separación de los distintos productos originados, como se describe en Méndez *et al.* (1992).

Cuando se utilizaron como molde oligonucleótidos de banda simple, la reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones, pero usando como sustrato en vez de TP-DNA, 2 μ M del oligonucleótido indicado en presencia de 1mM MnCl₂. Las muestras fueron incubadas a 12 °C durante 1 hora.

2.9. Ensayos de elongación truncada de los oligonucleótidos de banda simple

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico, 1 μ Ci [α -³²P] dATP, 160 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante, 60 nM de la DNA polimerasa D12A/D66A, 0,4 μ M

del oligonucleótido indicado (banda simple o banda doble), 5 μ M de dATP, dGTP, dTTP, 500 μ M de ddCTTP y 1 mM MnCl_2 . Tras la incubación durante 15 minutos a 12 °C (banda simple) o 30 °C (banda doble) la reacción se detuvo mediante la adición de 10 mM EDTA-0,1% SDS, y las muestras se filtraron en columnas de Sephadex G-50. Los productos se analizaron por electroforesis en geles del 12% PAGE-SDS (360 mm x 280 mm x 0.5 mm).

2.10. Ensayos de amplificación del TP-DNA

La mezcla de reacción contenía en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico, 80 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci [α - 32 P] dATP, 10 mM MgCl_2 , 31pM TP-DNA, 6,5 nM de DNA polimerasa *wild-type*, 6,5 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante, 30 μ M de la SSB de ϕ 29 y 35 μ M de la DBP de ϕ 29. Las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado y después se detuvieron con 10 mM EDTA-0.1% SDS. El procesamiento de las muestras fue análogo al descrito para el ensayo de replicación de TP-DNA de ϕ 29.

Para estudiar la función de las TPs mutantes como TPs parentales, se llevó a cabo el ensayo de amplificación en las mismas condiciones durante 80 minutos. Después, la reacción se suplementó con el heterodímero DNA polimerasa/TP indicado (6,5 nM TP y 6,5 nM DNA polimerasa) y la incubación se mantuvo durante 90 minutos adicionales. Diferentes alícuotas de la mezcla de reacción fueron retiradas a los tiempos indicados y procesadas tal y como se describe arriba.

2.11. Preparación del DNA reconstituido

La degradación de los extremos 3' del TP-DNA se realizó durante 15 min con DNA polimerasa Vent a 75 °C. La mezcla de incubación contenía 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM sulfato amónico, 10 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 0,1% Triton y 6 nM TP-DNA. El producto obtenido de la degradación se hibridó con el oligonucleótido indicado en una mezcla de reacción que contenía 20 mM del oligonucleótido 29mer de banda simple utilizado en cada caso, 1.8 mM EDTA, 150 mM NaCl y 0,02% (v/v) Tween durante 5 minutos a 75 °C. La temperatura bajó hasta 55 °C durante 99 minutos, permaneciendo a 55 °C durante 5 minutos. Después se siguió disminuyendo la temperatura hasta 4 °C durante 15 minutos.

2.12. Balance de las actividades de exonucleasa 3'-5' y de polimerización 5'-3' (balance *exo/pol*)

La molécula sp1/sp1c+6 (molde/iniciador) contiene un extremo 5' protuberante de 6 nucleótidos de tal forma que puede ser utilizada como sustrato de banda doble de la actividad 3'-5' exonucleasa o como sustrato de la polimerización dependiente de DNA. La mezcla de

incubación contenía, en un volumen final de 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 1,2 nM del sustrato 15mer/21mer marcado en 5' (del 15mer), 30 nM de la DNA polimerasa de ϕ 29 *wild-type* o mutante y en presencia de concentraciones crecientes de los cuatro dNTPs (según se indica). Tras la incubación durante 5 minutos a 25 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA hasta una concentración final de 10 mM. Las muestras se analizaron en geles del 20% poliacrilamida-8M urea y posterior autorradiografía. Las actividades de polimerización y exonucleasa se determinaron por aumento o disminución, respectivamente, de la longitud inicial del sustrato marcado (15mer).

2.13. Ensayo de polimerización con mutantes deficientes en la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa de ϕ 29

La reacción se llevó a cabo esencialmente como se describe para los ensayos del balance exo/pol en presencia de 30 nM del mutante de la DNA polimerasa deficiente en la actividad exonucleasa indicado y con la concentración indicada de los cuatro dNTPs. Después de la incubación durante 5 minutos a 25 °C la reacción se detuvo añadiendo EDTA hasta una concentración final de 10 mM. Las muestras fueron analizadas en geles del 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.14. Replicación del DNA de M13: síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 25 μ l, 50 mM Tris-HCl pH7,5, 4% (v/v) glicerol, 0,1mg/ml BSA, 1mM DTT, 20 mM sulfato amónico, 40 μ M dNTP, 1 μ Ci [α -³²P] dATP, 10 mM MgCl₂, 4,2 nM de ssDNA M13mp18 hibridado al iniciador universal de 17mer y 60 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado en cada caso, se pararon con 10 mM EDTA-0,1% SDS y posteriormente se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50 con el objeto de eliminar los dNTPs no incorporados. La actividad relativa de las DNA polimerasas mutantes con respecto a la *wild-type* se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido de cada muestra después del filtrado. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0,7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0,7% (McDonell *et al.*, 1977). El gel fue posteriormente secado y autorradiografiado.

2.15. Medida de la afinidad por el nucleótido entrante de las DNA polimerasas mutantes.

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂ y 0,9 nM del sustrato sp1/sp1c+14A (15mer/29mer) marcado en el extremo 5' del 15 mer. El tiempo de reacción y la

concentración de enzima utilizados se ajustaron en cada polimerasa para optimizar la detección y asegurar que todas las reacciones se llevaron a cabo en estado estacionario. Sólo las reacciones que ocurrieron en el rango lineal de utilización de sustrato (< 30% de extensión del iniciador) se usaron para el análisis. Las muestras se incubaron de 15 a 30 segundos en presencia de concentraciones crecientes de nucleótido entrante a 30 °C y se detuvieron con la adición de EDTA 10 mM. Las muestras fueron analizadas en geles del 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. La cantidad de producto elongado fue representada frente a la concentración de dTTP. Los valores para la K_m por nucleótido se obtuvieron ajustando los datos a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados usando el software Kaleidagraph 3.6.4. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar y corresponden a cuatro experimentos independientes.

2.16. Hidrólisis de 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5' monofosfato (*p*NP-TMP)

La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 300 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM $MnCl_2$, 3 mM of *p*-nitrofenil-TMP (*p*NP-TMP) disuelto en 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 y 150 mM NaCl, y 500 nM de cada DNA polimerasa de ϕ 29, *wild-type* o mutante. La hidrólisis se analizó monitorizando la producción de *p*-nitrofenol (*p*-NP) a una longitud de onda de 420 nm con un espectofotómetro Hitachi U-200 a 25 °C (Hamdan *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004). La producción de *p*-NP fue representada frente al tiempo y los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados usando el software Kaleidagraph 3.6.4. La zona lineal de producción de *p*-NP se obtuvo en el intervalo 5-100 segundos. El valor de la pendiente, obtenido por métodos de regresión lineal, permitió calcular la eficiencia catalítica de la reacción (s^{-1}).

2.17. Ensayos de exonucleasa 3'-5'

La reacción se realizó en un volumen de 12.5 μ l, y contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM $MgCl_2$ and 12 nM de cada DNA polimerasa de ϕ 29 *wild-type* o mutante. Como sustrato de DNA de banda simple se utilizó 1.2 nM del oligonucleótido 15mer, 14,5 nM del oligonucleótido de 5mer o 18 nM del 4mer, marcados radiactivamente en sus extremos 5'. Los ensayos de la actividad exonucleasa en banda doble se realizaron usando como sustrato 1,2 nM de la molécula híbrida 15mer/21mer. Las muestras fueron incubadas a 25 °C por el tiempo indicado en cada caso y se detuvieron añadiendo EDTA hasta una concentración final de 10 mM. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M y autorradiografía.

La degradación total se obtuvo calculando el número de eventos catalíticos que dieron lugar a los diferentes productos de degradación. A partir de estos datos pudimos calcular la eficiencia catalítica de cada polimerasa mutante y relativizarla a la de la proteína *wild-type*.

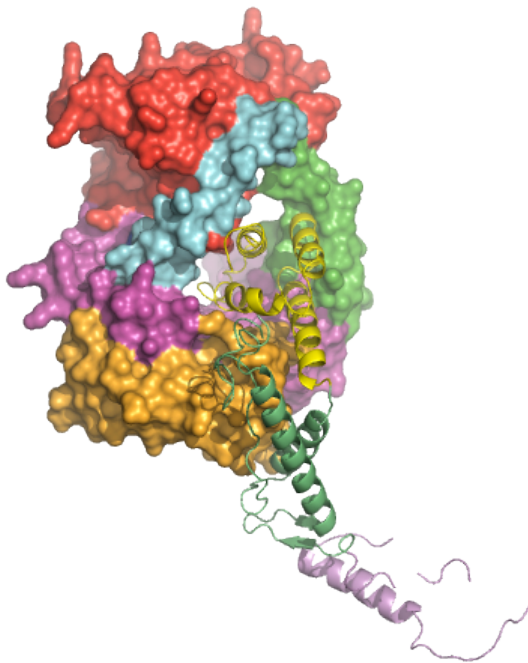
2.18. Degradación exonucleolítica en un solo evento de unión

La mezcla de incubación contenía, en 12,5 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glycerol, 0,1 mg/ml BSA, 12 nM de la DNA polimerasa de ϕ 29 *wild-type* o mutante y 0,36 nM del sustrato 30mer/36mer marcado en su extremo 5'. Después de 15 minutos de incubación a 4 °C para permitir la formación de un complejo entre la DNA polimerasa y el sustrato de DNA para la exonucleolisis, la reacción comenzó por la adición de 10 mM MgCl₂ y 0,36 μ M de 30mer/36mer no marcados radiactivamente como trampa de DNA. Las muestras se incubaron durante el tiempo indicado a 25 °C, la reacción se detuvo añadiendo EDTA hasta la concentración final de 10 mM y posteriormente los productos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M y autorradiografía.

2.19. Ensayos de retraso en gel

El estudio de la interacción entre la DNA polimerasa de ϕ 29 *wild-type* o mutante con un sustrato de DNA de banda doble con una estructura molde/iniciador se llevó a cabo con el híbrido sp1/sp1c+6 marcado en el extremo 5'. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 20 μ l, 12 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM MgCl₂, 0,7 nM de 15mer/21mer y la cantidad indicada de DNA polimerasa *wild-type* o mutante deficiente en la actividad exonucleasa 3'-5'. Después de una incubación de 5 minutos a 4 °C, las muestras se sometieron a electroforesis en geles previamente enfriados de poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 80:1, p/p) al 4% (p/v) que contenía 12 mM Tris-acetato (pH 7,5) y 1 mM EDTA. Tras la electroforesis llevada a cabo a 4 °C en el mismo tampón a 8 V/cm (Carthew *et al.*, 1985), los complejos DNA polimerasa/DNA se detectaron en las autorradiografías como un retraso en la movilidad del sustrato marcado. La medida de la afinidad por el DNA de las DNA polimerasas mutantes respecto al enzima *wild-type* se obtuvo mediante densitometría de los complejos enzima/DNA.

RESULTADOS



Capítulo I:

Implicación de los residuos de los dominios iniciador e intermedio de la TP de ϕ 29 en la formación de un heterodímero estable y funcional con la DNA polimerasa replicativa.

1. Implicación de los residuos de los dominios iniciador e intermedio de la TP de $\phi 29$ en la formación de un heterodímero estable y funcional con la DNA polimerasa replicativa

La iniciación de la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ requiere la formación previa de un heterodímero entre la DNA polimerasa y la TP iniciadora que posteriormente reconoce los orígenes de replicación constituidos por la TP paterna y una secuencia específica de DNA. La resolución de la estructura cristalográfica del complejo formado por la DNA polimerasa y la TP mostró que la TP está formada por tres dominios: el dominio N-terminal (residuos 1-73) responsable de la localización de la TP en el nucleoide bacteriano (Muñoz-Espín *et al.*, 2010), el dominio intermedio (residuos 74-172) que confiere especificidad a la unión con la DNA polimerasa (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007) y que se conecta a través de un *loop* flexible con el dominio iniciador (residuos 173-266) que contiene la serina iniciadora (Kamtekar *et al.*, 2006).

Tanto el dominio intermedio como el iniciador de la TP realizan amplios contactos con la DNA polimerasa, debido a la alta afinidad que tienen por ésta. El reconocimiento específico entre la DNA polimerasa y la TP se debe principalmente a la interacción entre el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa (representado en amarillo en la Figura 11) y el dominio intermedio de la TP (representado en verde en la Figura 11) (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). En esta superficie de interacción hay varios residuos cargados que forman puentes salinos entre residuos de arginina de la TP y residuos ácidos de glutámico del subdominio TPR1 (Arg158:Glu291; Arg169:Glu322).

En contraste con el dominio intermedio, el dominio iniciador de la TP es electronegativo, mimetizando al DNA en su interacción con la DNA polimerasa. Se han predicho interacciones específicas entre residuos ácidos de la TP con aminoácidos cargados positivamente del subdominio *thumb* de la polimerasa, como ocurre entre Glu191:Arg575 o Asp198:Lys557 (Kamtekar *et al.*, 2006). Asimismo, el residuo de Arg69 del dominio exonucleasa de la polimerasa interaccionaría con los residuos Gln253 y Tyr250 mediante un puente de hidrógeno y una interacción de apilamiento, respectivamente.

Además, la hélice C-terminal del dominio iniciador forma también puentes de hidrógeno con el subdominio TPR2 de la polimerasa, a través de los residuos Glu252, Gln253 y Arg256 de la TP con los residuos Leu416, Gly417 y Glu419 de la DNA polimerasa, respectivamente (Kamtekar *et al.*, 2006).

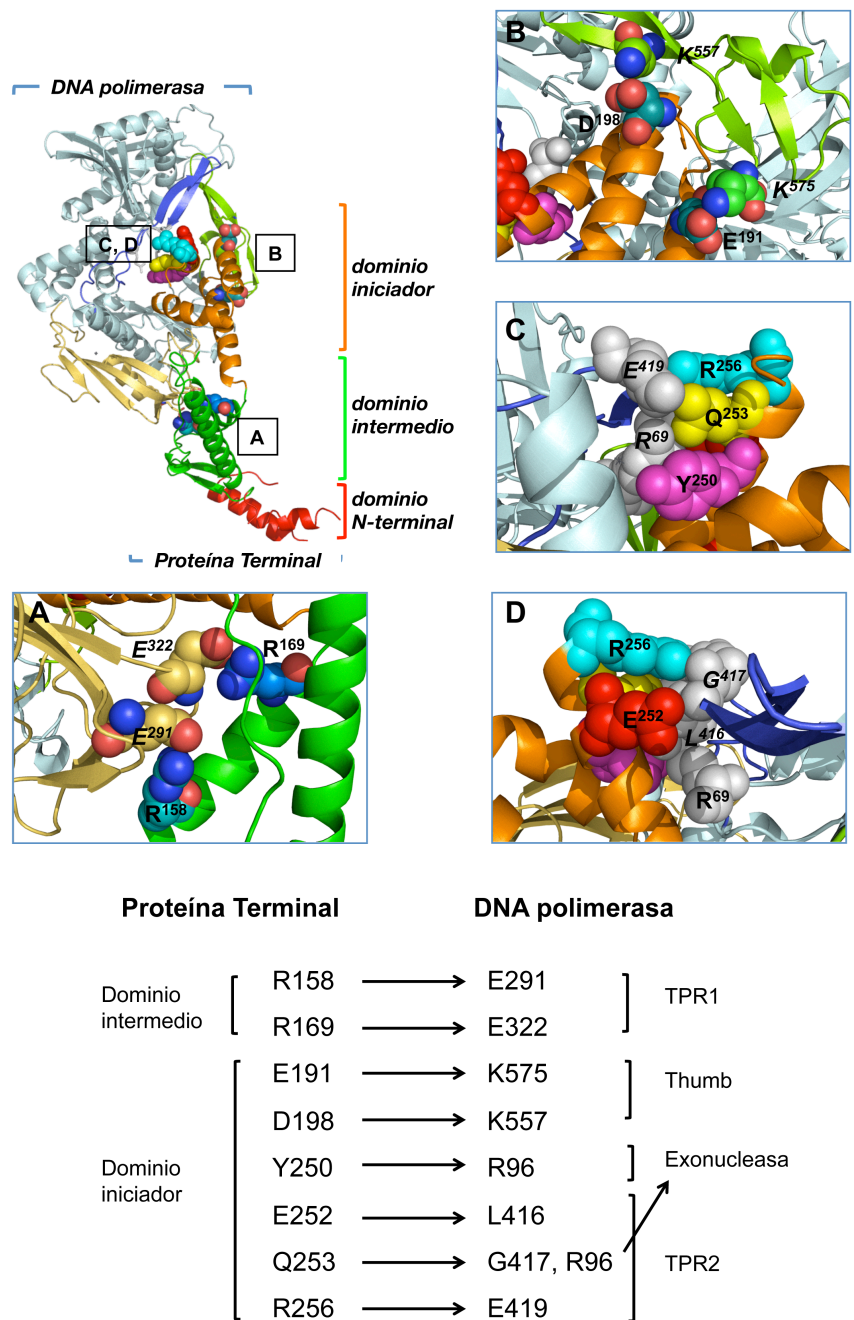


Figura 11: Representación estructural del heterodímero TP/DNA polimerasa de $\phi 29$. La DNA polimerasa aparece representada en color azul, excepto los subdominios TPR1, TPR2 y *thumb* que están coloreados en amarillo, azul oscuro y verde claro, respectivamente. **(A)** Detalle de los residuos Arg158 y Arg169 del dominio intermedio de la TP, de los que se ha propuesto que interaccionan mediante puentes salinos con los residuos Glu291 y Glu322, respectivamente, del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa. **(B)** Se muestran las interacciones propuestas entre los residuos Glu191 y Asp198 del dominio intermedio de la TP con los residuos Lys575 y Lys557 del subdominio *thumb* de la DNA polimerasa, respectivamente. **(C)** Se detallan las interacciones propuestas entre los residuos Q253, Y250 y R256 con el residuo Arg96, del dominio exonucleasa, y Glu419, del subdominio TPR2, respectivamente. **(D)** Aparece representada la interacción propuesta entre el residuo Glu252 del dominio iniciador de la TP con el residuo Leu416 del subdominio TPR2 de la DNA polimerasa. Las coordenadas de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP fueron tomadas del PDB 2EX3. La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>). **Esquema de los residuos a estudio:** A la izquierda se muestran los residuos de la TP que se han mutado y su posible interacción con los residuos de la DNA polimerasa representados a la derecha indicando a qué dominio de la proteína pertenecen.

1.1. Mutagénesis dirigida de los residuos Arg158, Arg169, Glu191, Asp198, Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 de la TP de ϕ 29

Con el fin de estudiar el papel funcional de los residuos descritos anteriormente en la interacción con la DNA polimerasa de ϕ 29, llevamos a cabo mutagénesis dirigida a los mismos. Todos ellos fueron cambiados a alanina, eliminando la carga positiva de las argininas (R158A, R169A, R256A), el grupo polar de la glutamina (Q253A), la carga negativa de los glutámicos y el aspártico (E191A, D198A, E252A) y el grupo aromático de la tirosina (Y250A). Estas TPs mutantes fueron sobreexpresadas y purificadas como está descrito en Materiales y Métodos (Mencía *et al.*, 2011) y analizadas mediante ensayos *in vitro*.

Todas estas interacciones se representan en la Figura 11, donde se incluye un esquema de los residuos de la TP cambiados indicando a qué dominio pertenecen, así como el residuo de la DNA polimerasa con el que están interaccionando.

1.2. Las TPs mutantes presentan defectos en la interacción con la DNA polimerasa

La replicación del TP-DNA de ϕ 29 comienza en ambos orígenes del genoma. La DNA polimerasa forma un heterodímero con una molécula de TP libre y cataliza la inserción del 5'dAMP iniciador en el grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP en una reacción dirigida por molde. Para estudiar la función iniciadora de los mutantes de la TP se evaluó la formación del complejo TP-dAMP usando como sustrato el TP-DNA de ϕ 29 (reacción de iniciación). Como se observa en la Figura 12A y en la Tabla II, había mutantes severamente (R158A) o moderadamente (R169A, Q253A y R256A) afectados en la formación del TP-dAMP.

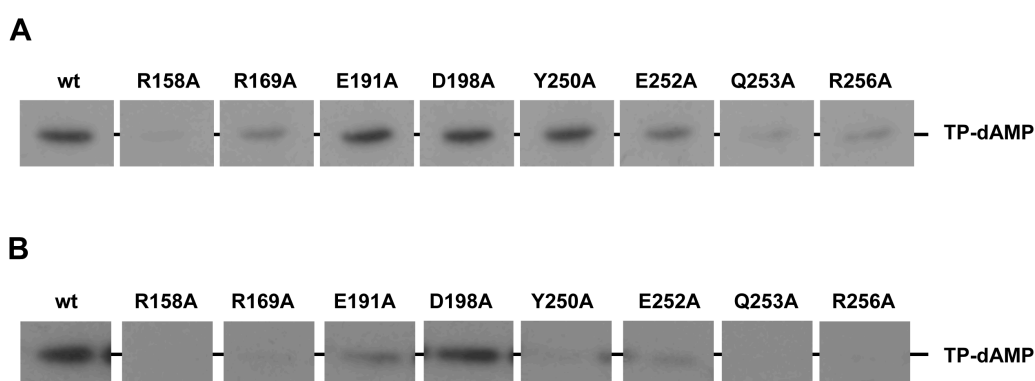


Figura 12: Formación *in vitro* del complejo TP-dAMP. (A) Iniciación usando como molde TP-DNA. La reacción se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 1,6 nM TP-DNA, 13 nM de DNA polimerasa *wild-type*, 13 nM de TP *wild-type* o mutante y 10 mM MgCl₂. Tras 4 minutos de incubación a 30 °C las reacciones fueron paradas y las muestras procesadas y analizadas por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. **(B)** Iniciación en ausencia de molde (sin TP-DNA). La reacción se llevó a cabo en presencia de 25 nM de DNA polimerasa, 25 nM de TP y 1 mM MnCl₂ durante 1,5 horas a 30 °C. La movilidad del complejo TP-dAMP se indica a la derecha.

La replicación de ϕ 29 es un proceso dirigido por molde, por lo tanto, los defectos en la iniciación pueden ser consecuencia de un reconocimiento o unión defectuosos al origen de

replicación. Para estudiar esta posibilidad utilizamos la capacidad de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de catalizar la desoxinucleotidilación de la TP en ausencia de molde (Blanco *et al.*, 1992). En estas condiciones, la formación del TP-dAMP se debe exclusivamente a la interacción funcional entre la DNA polimerasa y la TP. Como se muestra en la Tabla II y en la Figura 12B todos los mutantes, excepto el D198A, presentaron defectos en la formación del TP-dAMP. Así, no se detectó actividad en los mutantes R158A, R169A, Q253A y R256A, mientras que los mutantes E191A e Y250A presentaron una disminución en su actividad como iniciadores de 3 y 7 veces respecto a la iniciación dirigida por molde. Estos bajos niveles de TP-desoxinucleotidilación mostrados por los mutantes de la TP, descartan un defecto en el reconocimiento del origen de replicación y podrían deberse a una interacción defectiva con la DNA polimerasa.

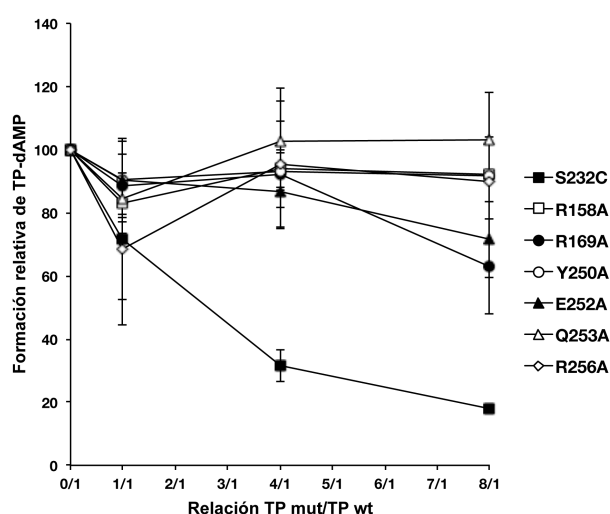


Figura 13: Ensayos de competición entre la TP *wild-type* y las TPs mutantes por la unión a la DNA polimerasa. El ensayo de formación de TP-dAMP en ausencia de molde se llevó a cabo en presencia de concentraciones crecientes de las TPs mutantes. Las reacciones se iniciaron adicionando 1 mM $MnCl_2$ y se incubaron durante 90 minutos a 30 °C. Se indica la formación de TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición respecto al formado en ausencia de competición (100%). Como control se utilizó el mutante de TP S232C (Garmendia *et al.*, 1990). Los datos representan la media y la desviación estándar correspondientes a tres experimentos independientes.

La capacidad de los mutantes para interaccionar con la DNA polimerasa se evaluó mediante ensayos de interferencia en los que la interacción entre la TP *wild-type* y la DNA polimerasa es competida por cantidades crecientes de mutantes de la TP (ver Materiales y Métodos). Como control, se utilizó el mutante S232C de la TP debido a que es esencialmente inactivo como iniciador, ya que carece del grupo hidroxilo, pero conserva intacta su capacidad para interaccionar con la DNA polimerasa (Garmendia *et al.*, 1990). Como se esperaba, el perfil de inhibición obtenido con este mutante coincide con el perfil teórico. Como se observa en la Figura 13 la TP *wild-type* no fue competida por los mutantes R158A, Y250A, Q253A y R256A, y solo ligeramente cuando hubo un exceso de 8 veces de los mutantes R169A y E252A. Estos resultados indican un defecto en la interacción de estos mutantes con la DNA polimerasa.

La interacción de los mutantes con la DNA polimerasa fue también analizada directamente mediante ultracentrifugación en gradientes de glicerol en presencia de 0.2 M NaCl (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 14, la TP *wild-type* formó un heterodímero con la DNA polimerasa, cosedimentando ambas proteínas en la mismas fracciones. Lo mismo ocurrió con los mutantes de la TP, excepto con el R158A que no está interactuando con la DNA polimerasa y sedimentó en forma de monómero e independientemente de la DNA polimerasa.

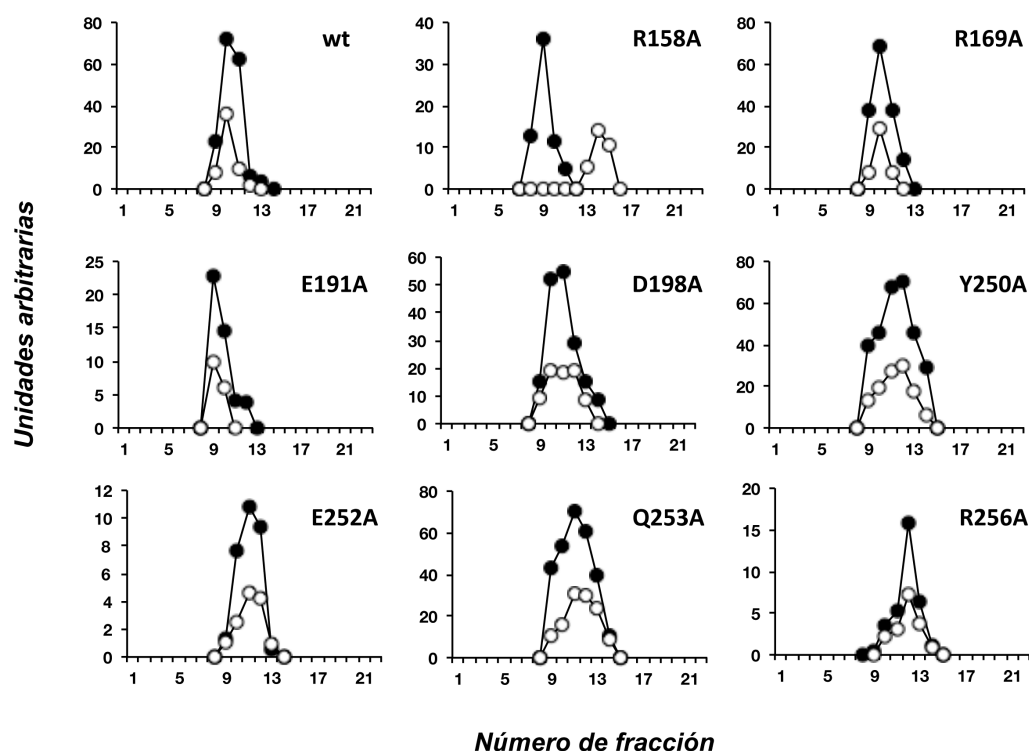


Figura 14: Análisis de la interacción entre la DNA polimerasa y la TP por ultracentrifugación en gradiente de glicerol en presencia de 0,2 M NaCl. El ensayo se llevó a cabo preincubando 0,6 μ M de DNA polimerasa y 0,6 μ M de TP durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente las muestras se cargaron en la parte superior de un gradiente de glicerol continuo 15%-30% (4 ml) en presencia de 0,2 M NaCl y se centrifugaron como se describe en Materiales y Métodos. Tras la centrifugación se fraccionaron los gradientes, se sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron con SYPRO. En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica en unidades arbitrarias de la DNA polimerasa (círculos negros) y la TP (círculos blancos).

Aunque parece que la estabilidad del heterodímero no está afectada por las mutaciones introducidas, la pobre desoxinucleotidilación exhibida por los mutantes en ausencia de molde, así como la falta de competición con la TP *wild-type* que muestran en los ensayos de interferencia, pueden estar reflejando una interacción no funcional con la DNA polimerasa.

Cuando se realizó el ensayo anterior en presencia de 0,4 M NaCl (Figura 15) sólo los mutantes E191A y D198A (además de la TP *wild-type*) seguían formando un heterodímero estable con la DNA polimerasa. Los mutantes R158A, R169A, Y250A, E252A, Q253A y

R256A, eluyeron por separado a la DNA polimerasa, mostrando que la interacción con ésta no es tan estable como la de la TP *wild-type*.

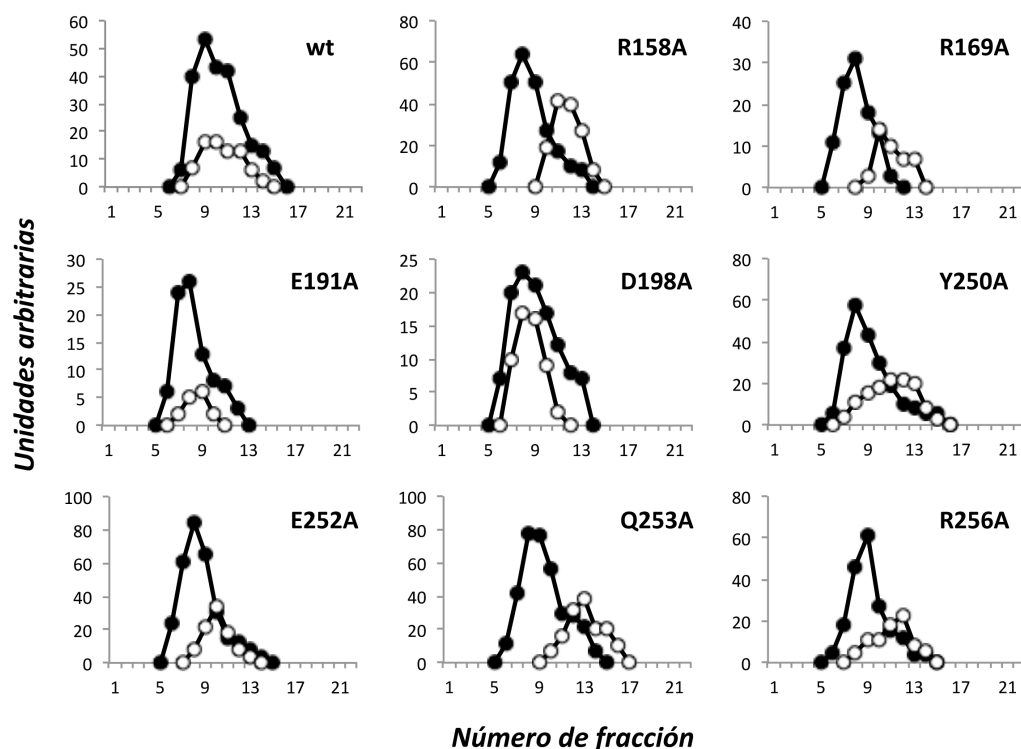


Figura 15: Análisis de la interacción entre la DNA polimerasa y la TP por ultracentrifugación en gradiente de glicerol en presencia de 0,4 M NaCl. El ensayo se realizó como se explica para el gradiente de glicerol a 0,2 M NaCl, pero en presencia de 0,4 M NaCl. En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica en unidades arbitrarias de la DNA polimerasa (círculos negros) y la TP (círculos blancos).

1.3. Replicación del TP-DNA. Importancia de los residuos mutados en la etapa de transición

Una vez que la DNA polimerasa ha catalizado la formación del TP-dAMP, la misma polimerasa cataliza la elongación del producto de iniciación de manera procesiva y mediante un mecanismo de desplazamiento de banda para producir la longitud completa del TP-DNA de $\phi 29$. Para evaluar si los defectos en la interacción DNA polimerasa/TP estarían afectando al proceso de replicación realizamos ensayos usando un sistema mínimo de replicación basado en el TP-DNA de $\phi 29$, la DNA polimerasa y la TP (Blanco *et al.*, 1989), como se describe en Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 16 y en la Tabla II, cuando el mutante R158A se utiliza como iniciador, la eficiencia de la reacción de la DNA polimerasa fue seis veces menor que la que se obtiene utilizando la TP *wild-type*, lo cual concuerda con su bajo nivel de formación de TP-dAMP en la reacción de iniciación. Sin embargo, cuando el resto de los mutantes fueron utilizados como iniciadores la eficiencia de la reacción estaba ligeramente afectada, como en el caso de los mutantes R169A, D198A, Q253A y R256A o nada afectada en

los mutantes E191A, Y250A y E252A que a pesar de sus defectos en la interacción con la DNA polimerasa mostraron unos valores similares a los obtenidos con la TP *wild-type*. Estos resultados sugieren que la formación de un heterodímero catalíticamente competente depende de los contactos con la TP parental que pueden aliviar al menos parcialmente los defectos causados por la mutación introducida en la TP.

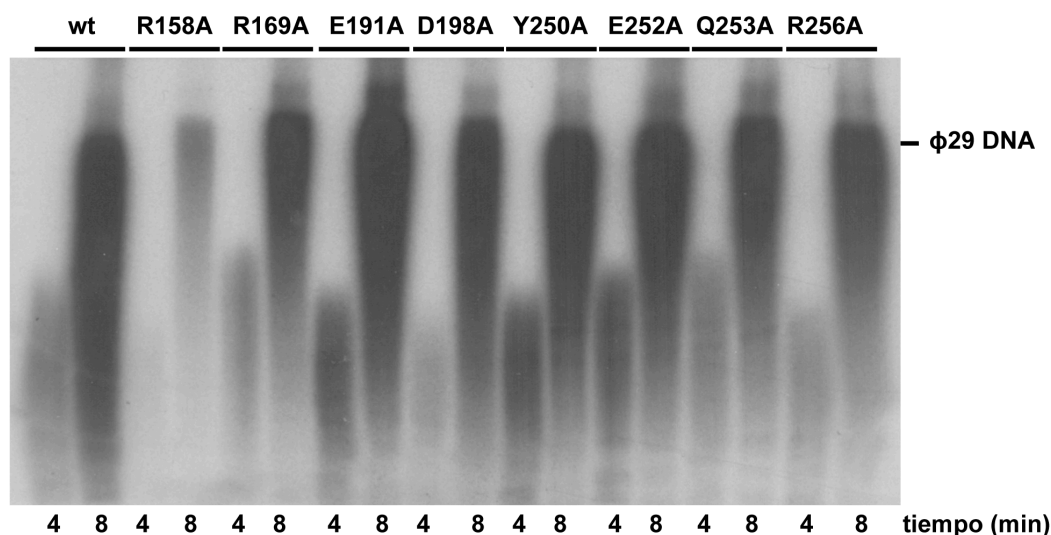


Figura 16: Replicación del TP-DNA *in vitro*. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 10 mM MgCl₂, 1,6 nM TP-DNA, 13 nM de DNA polimerasa *wild-type* y 13 nM de TP *wild-type* o mutante. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 30 °C y se procesaron como se describe para el ensayo de iniciación de la replicación. El DNA marcado fue desnaturalizado y sometido a electroforesis en un gel de agarosa alcalino para determinar la longitud del producto sintetizado. Se indica la posición de la longitud unidad del DNA de $\phi 29$.

Después de que la reacción de iniciación haya tenido lugar, el heterodímero permanece como complejo. Una vez que el décimo nucleótido es incorporado, la interacción entre las dos proteínas se deshace, permitiendo que la molécula de DNA polimerasa continúe con la replicación (Méndez et al., 1997). Este estadio es conocido como transición. Por lo tanto, teniendo en cuenta la baja actividad de iniciación de las TP mutantes R169A, Q253A y R236A, su inesperada elevada capacidad de replicación podría sugerir que presentan una mayor capacidad de transición que el enzima *wild-type*, contrarrestando el reducido número de eventos de iniciación. Para estudiar esta posibilidad, se analizaron los productos abortivos de reacción que se obtiene en presencia de los tres dNTPs (excepto dCTP). Para mejorar la detección tanto de los productos de iniciación no elongados como de los parcialmente elongados, se utilizó el mutante N62D de la DNA polimerasa, debido a su baja actividad exonucleasa que previene la degradación de dichos productos pero mantiene la capacidad de desplazamiento de banda (de Vega et al., 1996).

Tabla II. Funciones de las TPs *wild-type* y mutantes de $\phi 29$

$\phi 29$ TP	Formación de TP-dAMP ^a		Replicación del TP-DNA ^a	Transición ^{a,c}	Amplificación del TP-DNA	
	TP-DNA ^b	Sin molde			(%) ^a	Factor de amplificación ^d
<i>wild-type</i>	100	100	100	1	100	50 ± 7
R158A	4 ± 1.5	n.d.	17 ± 3	n.d.	1 ± 0,2	1 ± 0,1
R169A	23 ± 6	n.d.	75 ± 13	1,7 ± 0,4	3 ± 0,3	3 ± 0,2
E191A	94 ± 11	30 ± 8	106 ± 17	2,2 ± 0,3	69 ± 2	35 ± 6
D198A	112 ± 1	102 ± 3	66 ± 8	0,3 ± 0,2	121 ± 10	61 ± 13
Y250A	74 ± 24	10 ± 2	100 ± 20	3,3 ± 0,4	130 ± 4	66 ± 10
E252A	70 ± 28	n.d.	103 ± 25	3,2 ± 0,8	52 ± 7	27 ± 7
Q253A	23 ± 5	n.d.	55 ± 12	4,7 ± 0,7	20 ± 6	10 ± 4
R256A	20 ± 8	n.d.	76 ± 19	2,6 ± 1,2	16 ± 5	10 ± 1

Los datos representan el valor medio y la desviación estándar obtenida de al menos tres experimentos independientes.

^aLos números indican la actividad de las TP mutantes con respecto a la TP *wild-type*.

^bFormación de TP-dAMP usando el TP-DNA de $\phi 29$ como molde de la reacción.

^cLa eficiencia de la transición fue calculada como la proporción entre los productos TP-(dNMP)₆₋₁₄/TP-(dNMP)₁₋₂ considerando tal cociente 1 en el caso de la TP *wild-type*. Ver detalles en el texto principal.

^dEl factor de amplificación se calculó como la proporción entre la cantidad de DNA al final de la reacción (DNA inicial y sintetizado) y la cantidad de DNA inicial.

n.d. No detectado.

Como vemos en la Figura 17, cuando la DNA polimerasa utilizó como iniciador la TP *wild-type* se obtuvieron las bandas de TP(dAMP)₁₋₂ y TP(dNMP)₈ que corresponden a la elongación truncada a partir del origen derecho y una pequeña cantidad de TP(dNMP)₆ que probablemente corresponda a las moléculas abortadas durante la transición de la iniciación a la replicación. Con algunos de los mutantes, la DNA polimerasa dió lugar al producto adicional TP(dAMP)₁₄ debido a una incorporación errónea en la posición 12 del origen derecho seguido de elongación, como previamente se describió que ocurría con la DNA polimerasa mutante N62D (Dufour *et al.*, 2003). Cuando los mutantes R169A, E191A, Y250A, E252A, Q253A y R256A fueron utilizados como TP iniciadoras, la proporción entre los productos truncados [TP-(dNMP)₆₋₁₄] y los complejos de iniciación [TP-(dAMP)₁₋₂] fue mayor que la obtenida con la TP *wild-type*, explicando su mejora en la replicación con respecto a la iniciación. Esta mayor eficiencia podría explicarse por una débil interacción entre la DNA polimerasa y la TP que favorece la transición de la DNA polimerasa de $\phi 29$ a la etapa de elongación y además explicaría los bajos niveles de iniciación en comparación con los altos niveles de replicación obtenidos con estos mutantes. Por otro lado, el mutante D198A dió lugar a una menor proporción de productos intermedios con respecto a los productos de iniciación y por lo tanto a una menor eficacia en la transición que es consistente con su reducida capacidad de replicación del TP-DNA en comparación con sus niveles de iniciación *wild-type*.

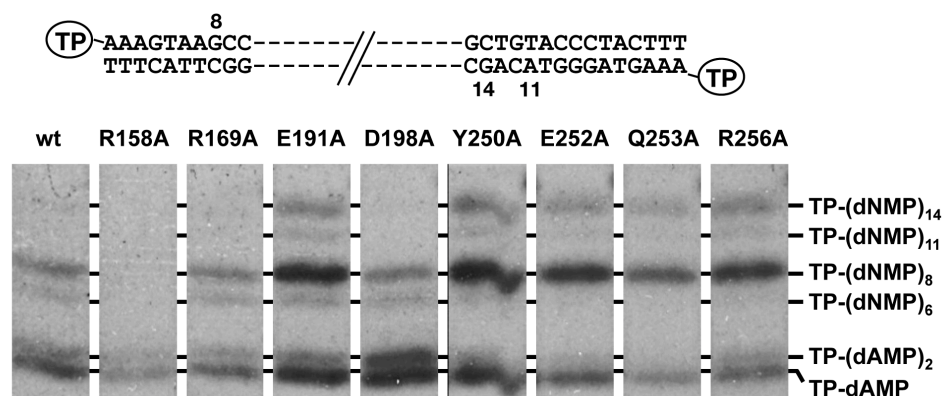


Figura 17: Análisis de los productos de transición de la replicación de $\phi 29$. El análisis se realizó en presencia de 1,6 nM TP-DNA, 13 nM de DNA polimerasa mutante N62D (de Vega *et al.*, 1996), 13 nM de TP *wild-type* o mutante, 10 mM MgCl₂ y 5 μ M dATP, dGTP y dTTP. Tras 2 minutos de incubación a 30 °C las reacciones fueron paradas y las muestras procesadas como se describe en Materiales y Métodos, analizándose en geles de alta resolución para poder detectar los diferentes productos de transición. Los distintos productos obtenidos durante los primeros pasos de la replicación, empezando desde ambos extremos del TP-DNA de $\phi 29$ [TP-dAMP, TP-(dAMP)₂, TP-(dNMP)₈ y TP-(dNMP)₁₁] así como TP-(dNMP)₆ y TP-(dNMP)₁₄ están indicados.

Se ha descrito que una vez que la DNA polimerasa cataliza la formación del TP-dAMP frente a la segunda timina en 3' de la cadena molde, el producto de iniciación se transloca una posición hacia atrás para recuperar la información de la primera timina, mediante un mecanismo llamado *sliding-back* (Méndez *et al.*, 1992). Para determinar si el nucleótido complementario a la primera posición del molde es recuperado durante la elongación cuando se usan como iniciadoras las TPs mutantes, se llevaron a cabo ensayos de replicación en presencia de dATP, dGTP y ddTTP, como se describe en Materiales y Métodos. Para detectar mejor los complejos de iniciación no elongados y los productos parcialmente elongados, así como para prevenir la degradación de los intermedios de replicación se utilizó el mutante de la DNA polimerasa que carece de la actividad exonucleasa 3'-5' (D12A/D66A) (Bernad *et al.*, 1989). En estas condiciones, la DNA polimerasa debe detenerse tras la incorporación del ddTTP en la posición cinco, obteniéndose un producto de cinco nucleótidos de longitud tal y como se espera de la secuencia del molde (3' TTTCAT...) indicando que el TP-dAMP formado se transloca una posición hacia atrás para aparear con la primera T recuperando el primer nucleótido del molde. La presencia de un producto un nucleótido más corto indicaría un fallo en la realización del *sliding-back*. Como se observa en la Figura 18, cuando los mutantes R158A y el D198A fueron utilizados como iniciadores la banda correspondiente a cuatro nucleótidos es más intensa que la de cinco. Además, en el mutante D198A se ve muy marcada la banda correspondiente a la posición número dos, que sólo se aprecia levemente con el mutante R158A y con la TP *wild-type*. Estos resultados sugieren defectos en la translocación hacia atrás de los mutantes R158A y D198A. El resto de mutantes realizaron correctamente el *sliding-back*, recuperando la información del primer nucleótido del molde.

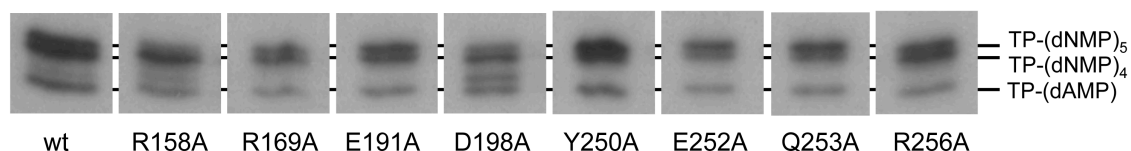


Figura 18: Estudio del mecanismo de sliding-back: recuperación del nucleótido del extremo 3'. El ensayo se realizó como se describe para el análisis de los productos de transición en presencia de 1,6 nM TP-DNA, 60 nM DNA polimerasa mutante D12A/D66A (Bernad *et al.*, 1989), 160 nM TP *wild-type* o mutante, 5 μ M dATP, dGTP y 500 μ M ddTTP. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 30 °C, y se procesaron y analizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los distintos productos obtenidos [TP-dAMP, TP-(dNMP)₄ y TP-(dNMP)₅] están indicados.

1.4. Amplificación del TP-DNA. Papel de las TPs mutantes como TPs parentales

Durante el ensayo de replicación del TP-DNA tiene lugar una única ronda de replicación, por lo que este experimento no permite estudiar los posibles defectos de las TPs mutantes en su función como TP paternas. Sin embargo, en los ensayos de amplificación que se realizan en presencia de DNA polimerasa y TP, la adición de DBP y SSB (proteínas que se unen a DNA de banda doble y simple, respectivamente) permite amplificar hasta tres órdenes de magnitud una cantidad limitante de TP-DNA inicial (Blanco *et al.*, 1994). En esta reacción de amplificación, la TP iniciadora acaba unida covalentemente a los extremos 5' del DNA recién sintetizado, actuando como TP paterna en la siguiente ronda de replicación.

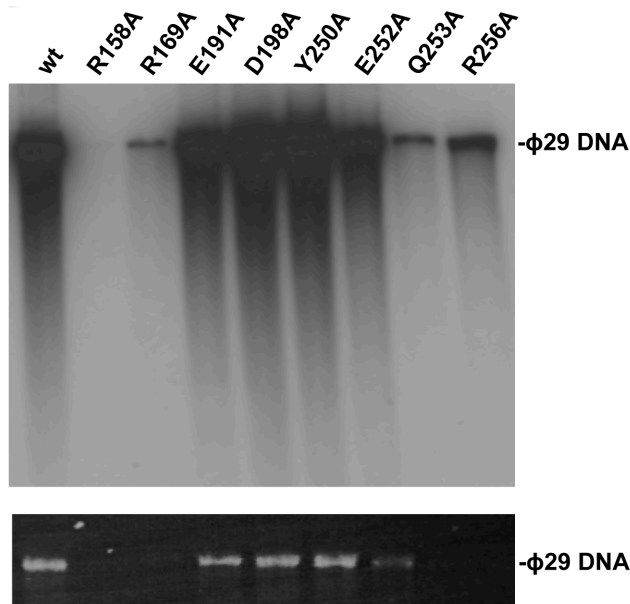


Figura 19: Amplificación del TP-DNA de ϕ 29. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 10 mM $MgCl_2$, 31pM TP-DNA, 6,5 nM DNA polimerasa *wild-type*, 6,5 nM TP *wild-type* o mutante, 30 μ M ϕ 29 SSB y 35 μ M ϕ 29 DBP. Las muestras se incubaron durante 80 minutos a 30 °C y la reacción se paró con 10 mM EDTA. El DNA marcado fue desnaturalizado y sometido a electroforesis en un gel de agarosa alcalino seguido de autorradiografía (panel superior) y tinción con bromuro de etidio (panel inferior). La posición de la longitud unidad del DNA de ϕ 29 está indicada.

En la Figura 19 se muestran las cantidades de DNA amplificado utilizando la TP *wild-type* y los mutantes. Los mutantes E191A, D198A e Y250A alcanzaron niveles de amplificación similares o incluso mayores que los alcanzados con la TP *wild-type*, como se muestra en la Tabla II. En el caso del mutante E252A el nivel de amplificación obtenido fue la mitad que con la TP *wild-type*. Sin embargo, los mutantes R158A, R169A, Q253A y R256A fueron

ineficientes en la reacción de amplificación, probablemente debido a su deficiente actividad como iniciadores, como se observa por sus bajos niveles de iniciación.

Estudiamos más a fondo estos últimos mutantes para entender los bajos niveles obtenidos en amplificación. Para ello, realizamos una cinética de amplificación en la que determinamos la cantidad de DNA sintetizado a lo largo del tiempo (Figura 20). A partir del análisis de la cantidad de radiactividad incorporada, pudimos obtener los datos para hallar el factor de amplificación, definido como la proporción entre la cantidad de DNA al final de la reacción (DNA inicial y DNA sintetizado) frente a la cantidad de DNA inicial. Como se observa en la Figura 20, usando la TP *wild-type*, la cantidad de DNA sintetizado alcanzó su máximo a los 40 minutos y dejó de aumentar con el tiempo, dando lugar a un factor de amplificación de 50. Mientras que la DNA polimerasa no sintetizó ningún producto detectable cuando utilizó como iniciador el mutante R158A, la síntesis de DNA con los mutantes Q253A y R256A siguió aumentando incluso en el mayor tiempo ensayado (160 minutos), sugiriendo que estos mutantes son más lentos a la hora de empezar nuevas rondas de replicación. Cuando el mutante R169A fue utilizado como iniciador, aunque la síntesis de DNA dejó de producirse a los 80 minutos, la cantidad de DNA sintetizada *de novo* corresponde a un factor de amplificación de 3, y nunca excede este valor ni en los mayores tiempos de ensayo.

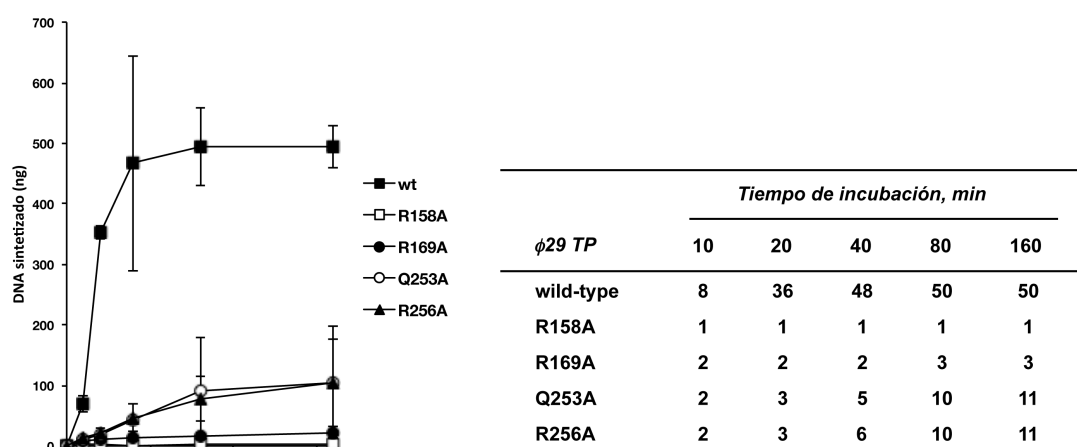


Figura 20: Cinética de amplificación. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Tras la incubación a 30 °C durante los tiempos indicados, las muestras se pararon y se cuantificó la cantidad total de dNTP incorporado. Los valores se representan como la media y la desviación estándar correspondiente a tres experimentos independientes. La tabla indica el factor de amplificación calculado como la proporción entre la cantidad de DNA al final de la reacción (DNA inicial y DNA sintetizado) y la cantidad de DNA inicial.

Este resultado sugiere que la síntesis del DNA ha parado antes de completar la segunda ronda de replicación, probablemente debido a la inactivación del origen de replicación tras la incorporación de la TP mutante que ahora actuaría como TP paterna. Si este fuera el caso, sólo los orígenes con la TP *wild-type* serían activos en la segunda ronda de replicación, lo que daría

lugar a un factor de amplificación de 3, como se ha descrito para otros mutantes (Illana *et al.*, 1999). Fue interesante comprobar que se produjo nueva inserción de dAMP tras la adición de heterodímero *wild-type* después de los ochenta minutos (Figura 21), lo cual descarta que la mutación hubiera afectado la estructura global de la TP paterna que habría causado la inactivación de los orígenes. Sin embargo, cuando el heterodímero que se añadió estaba formado por la DNA polimerasa y la TP mutante no hubo una nueva incorporación de dAMP, sugiriendo que la TP paterna R169A puede interaccionar funcionalmente con el heterodímero DNA polimerasa/TP *wild-type* pero no con el heterodímero que contiene la TP mutante. Por lo tanto, la mutación introducida es crítica cuando se encuentra simultáneamente presente como TP iniciadora y parental, probablemente afectando a la correcta interacción requerida entre ambas durante la reacción de iniciación.

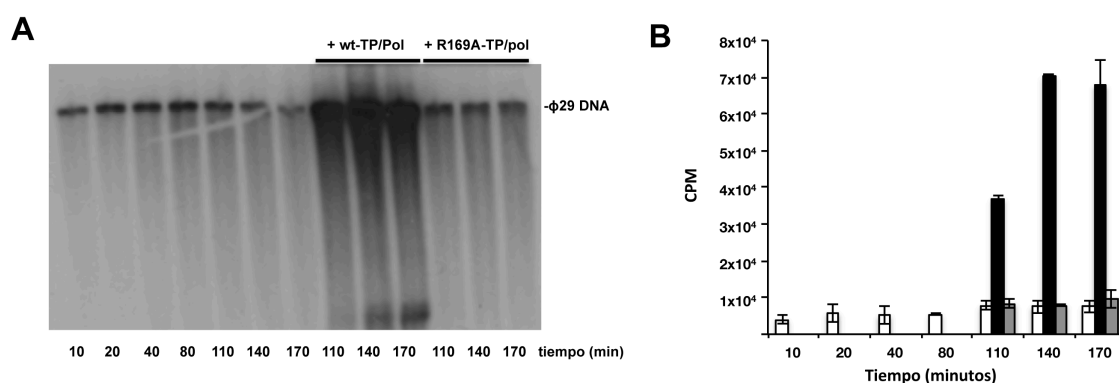
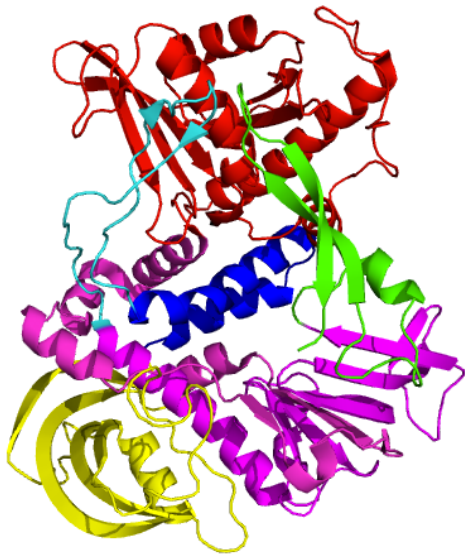


Figura 21: Recuperación de la amplificación con el mutante R169A de TP. (A) Los ensayos de amplificación se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Tras 80 minutos de incubación, se añadieron a la reacción heterodímeros TP/DNA polimerasa con la TP *wild-type* o con el mutante R169A. Las muestras se pararon al tiempo indicado. La cantidad de [α-³²P] dAMP incorporada se cuantificó a los tiempos indicados y aparece representado en (B). Las barras blancas indican la cantidad de [α-³²P] dAMP incorporado por la DNA polimerasa/mutante R169A TP a lo largo del experimento. Las barras negras indican la nueva incorporación de [α-³²P] dAMP tras la adición del heterodímero DNA polimerasa/TP *wild-type*. Las barras grises indican la nueva incorporación de [α-³²P] dAMP tras la adición del heterodímero DNA polimerasa/TP mutante R169A. Los datos representan la media y la desviación estándar correspondiente a cuatro experimentos independientes.

Todos estos resultados muestran que la sustitución de los residuos Arg158, Arg169, Glu191, Asp198, Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 tienen un efecto, o bien en la estabilidad del complejo TP/DNA polimerasa (R158A) o en la interacción funcional de la TP en el sitio activo de polimerización (R169A, E191A, Y250A, E252A, Q253A y R256A), afectando los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de φ29. Estos resultados nos permiten proponer un papel para estos residuos en el mantenimiento del equilibrio entre la estabilización del dominio iniciador de la TP y su salida gradual del sitio activo de polimerización de la DNA polimerasa según se va sintetizando el nuevo DNA (ver Discusión).



Capítulo II:

Papel dual del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA y del residuo iniciador de la TP en el centro activo de polimerización.

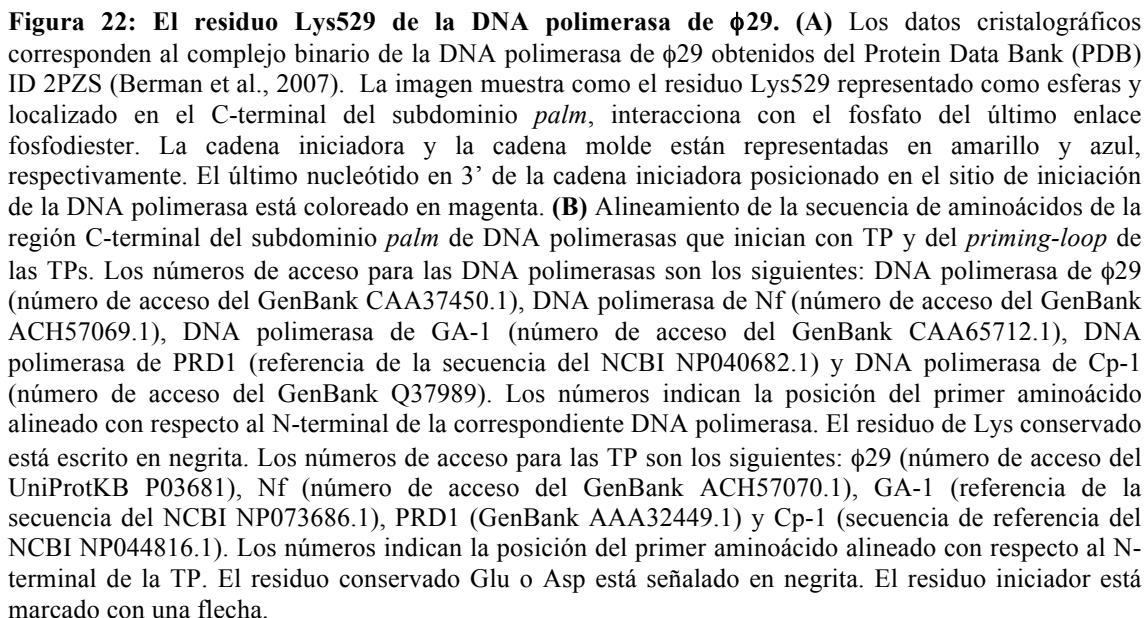
2. Papel dual del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA y del residuo iniciador de la TP en el centro activo de polimerización

La DNA polimerasa de ϕ 29 lleva a cabo la síntesis completa del TP-DNA de manera procesiva sin disociarse del DNA, acoplando la polimerización al desplazamiento de la cadena complementaria a la molde (desplazamiento de banda) sin la asistencia de helicasas ni factores de procesividad, a diferencia de la mayoría de las replicasas (Blanco *et al.*, 1989). Es el único miembro del subgrupo de DNA polimerasas que inician con TP cuya estructura ha sido resuelta (Kamtekar *et al.*, 2004), mostrando que está compuesta por un dominio N-terminal responsable de la actividad exonucleasa, y un dominio C-terminal responsable de la actividad de polimerización. Este último dominio presenta dos inserciones presentes específicamente en las polimerasas que inician la replicación con TP, llamadas TPR1 y TPR2. Estas inserciones junto con los subdominios universales *palm*, *thumb* y *fingers* forman una estructura de anillo interno que rodea al DNA de banda doble, producto de la iniciación y la elongación (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2004), proporcionando a la enzima sus inherentes características de elevada procesividad y la capacidad de desplazamiento de banda (Rodríguez *et al.*, 2005).

La resolución de la estructura cristalográfica de los complejos binario y ternario de la DNA polimerasa de ϕ 29 mostró que la DNA polimerasa establece contactos con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA de banda doble a través de algunas interacciones directas y numerosos puentes de hidrógeno (Berman *et al.*, 2007). Entre ellos, el residuo Lys529, que se encuentra en el extremo C-terminal del subdominio *palm*, forma un puente de hidrógeno con un grupo fosfato del enlace fosfodiéster entre el último y el penúltimo nucleótido en 3', tal y como se muestra en la Figura 22A. El alineamiento de secuencia de las DNA polimerasas de fagos que inician la replicación por un mecanismo mediado por TP como Nf, GA-1, PRD1 o Cp-1 mostró que esta Lys es además un residuo conservado (Figura 22B).

2.1. Mutagénesis dirigida del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29

Para estudiar el papel de esta lisina en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA en el centro activo de polimerización, así como en la coordinación entre las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5', el residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 se cambió a alanina, obteniéndose el mutante K529A en el que se eliminó la carga positiva, y a glutámico, obteniéndose el mutante K529E en el que se cambió la carga positiva por una negativa. Los mutantes fueron sobreexpresados y purificados, tal y como se describe en Materiales y Métodos, y sus eficiencias catalíticas analizadas mediante análisis bioquímicos *in vitro*.



Como en la mayoría de las replicasas, las actividades de polimerización y exonucleolisis de la DNA polimerasa de $\phi 29$ están presentes en dominios estructuralmente independientes

(Blanco y Salas, 1995; Kamtekar *et al.*, 2004). A pesar de su separación física, estas dos actividades opuestas deben actuar de forma coordinada para lograr una correcta y productiva síntesis del DNA, previniendo la acumulación de errores en la nueva cadena sintetizada sin comprometer una adecuada tasa de elongación (Garmendia *et al.*, 1992). La decisión de extender frente a degradar la molécula iniciadora finalmente depende de la tasa relativa de cada reacción catalítica (polimerización o exonucleolisis). Sin embargo, asumiendo una temperatura y fuerza iónica constantes y una ausencia de variaciones significativas en la concentración de dNTPs, el principal factor que controla este equilibrio es la estabilidad del sustrato en ambos centros activos (de Vega *et al.*, 1996; Truniger *et al.*, 1996).

Para evaluar si los cambios introducidos afectaban al equilibrio dinámico entre las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5', se llevó a cabo un ensayo de competición entre las actividades de síntesis/degradación en función de la concentración de dNTPs. Para ello, y tal y como se detalla en Materiales y Métodos, utilizamos una molécula híbrida molde/iniciador sp1/sp1c+6 (15mer/21mer) marcada radiactivamente en 5', que es sustrato de ambas actividades. En ausencia de nucleótidos, los únicos productos detectados provienen de la degradación del sustrato por la actividad exonucleasa 3'-5'. Al aumentar la concentración de nucleótidos se establece una competición entre las dos actividades por el extremo 3' de la cadena iniciadora, con un predominio de la actividad de polimerización frente a la de exonucleolisis a partir de una determinada concentración de dNTPs. La incorporación de dNTPs se observa como un incremento en la longitud de la cadena iniciadora marcada. La concentración de nucleótidos requerida para obtener una elongación eficiente puede usarse para definir la relación Exo/pol. De esta manera, si la actividad exonucleasa estuviera afectada, dicho equilibrio estaría desplazado hacia la polimerización, obteniendo una baja relación Exo/pol, mientras que si la actividad afectada fuese la de polimerización, el equilibrio se desplazaría hacia la actividad exonucleasa obteniendo una alta relación Exo/pol.

Como se observa en la Figura 23A y en la Tabla III, mientras que la DNA polimerasa *wild-type* requirió una concentración de dNTPs de 25-50 nM para competir a la actividad exonucleasa, el mutante K529A necesitó una concentración 32 veces mayor (800 nM) para obtener una elongación eficiente de la cadena iniciadora. El mutante K529E no fue capaz de elongar el sustrato ni a la máxima concentración de dNTPs ensayada (13 μ M). Es llamativa la fuerte actividad exonucleasa que presentaron ambos mutantes, como se observa comparando el carril sin nucleótidos de la DNA polimerasa *wild-type* con el de los mutantes.

Cuando el DNA es utilizado como iniciador, fallos en la incorporación de nucleótidos, así como mutaciones en el centro activo de polimerización pueden alterar el equilibrio Exo/pol hacia la degradación exonucleolítica del sustrato impidiendo un análisis específico de las características de la enzima. Por esta razón, decidimos incluir en los mutantes K529A y K529E, la mutación D12A/D66A (Bernard *et al.*, 1989) en dos residuos catalíticos del centro activo

exonucleasa para eliminar específicamente su actividad correctora de errores, obteniéndose los mutantes K529A^{Exo-} y K529E^{Exo-}. Como se muestra en la Figura 23B y en la Tabla III, a pesar de que el mutante K529A^{Exo-} presentó una eficiencia casi *wild-type* en la incorporación del primer nucleótido, incluso a las menores concentraciones de nucleótidos ensayadas, se requirió una concentración 8 veces mayor que la *wild-type*^{Exo-} para elongar hasta la posición 20. Sin embargo, el mutante K529E^{Exo-} estaba muy afectado y se limitó a la adición del primer nucleótido incluso en la mayor concentración de dNTPs ensayada. Además, el mutante K529E^{Exo-} presentó una elevada K_m por el nucleótido (171 ± 83 nM), en comparación con la de la DNA polimerasa *wild-type*^{Exo-} o del mutante K529A^{Exo-} (11.1 ± 2.6 nM y 14.7 ± 4.4 nM, respectivamente).

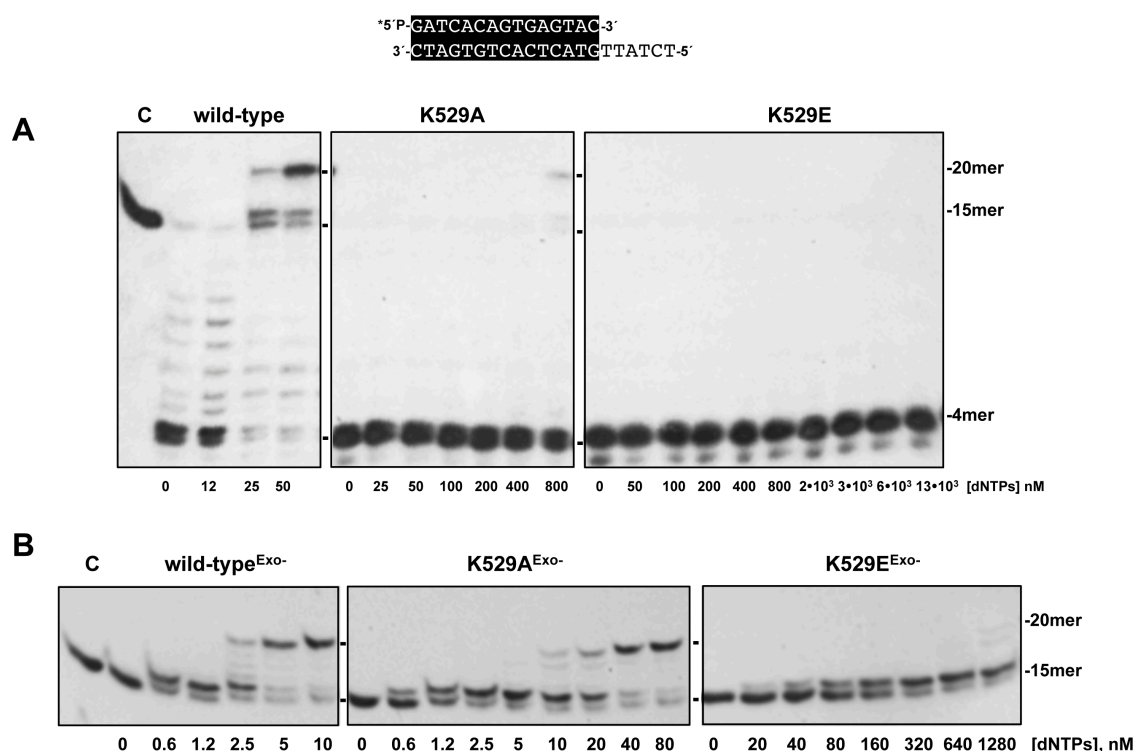


Figura 23: Balance entre las actividades de polimerización y exonucleolisis. (A) Balance Exo/pol de la DNA polimerasa *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 30 nM DNA polimerasa, 10 mM MgCl₂ y 1,2 nM del sustrato molde/iniciador 15mer/21mer marcado en 5' representado en la parte superior de la figura y con la concentración de nucleótidos indicada. La incubación se realizó durante 5 minutos a 25 °C. El asterisco indica que la cadena iniciadora está marcada radiactivamente en 5' con ³²P. La polimerización o exonucleolisis se detecta como un aumento o disminución en la longitud de la cadena iniciadora (15mer) marcada en 5'. La relación Exo/pol productiva se indica en la Tabla III. (B) Ensayo de polimerización catalizado por la DNA polimerasas *wild-type*^{Exo-} (D12A/D66A), K529A^{Exo-} (K529A/D12A/D66A) y K529E^{Exo-} (K529E/D12A/D66A). El ensayo se realizó en las mismas condiciones que el ensayo anterior (Exo/pol), y a la concentración de dNTPs indicada. C: Control de DNA.

Tabla III. Actividades enzimáticas de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes de $\phi 29$

Actividad ensayada	Sustrato	$\phi 29$ DNA polimerasa		
		<i>wild-type</i>	K529A	K529E
Balance Exo/pol*	molde/iniciador [†] , dNTPs	25/50	>800	>13x10 ³
Polimerización*	molde/iniciador [†] , dNTPs	2,5	20	>1280
3'-5' exonucleasa [‡]	molde/iniciador [†]	100	410±110	380±90
	ssDNA (15mer)	100	290±70	230±70
	ssDNA (5mer)	100	160±40	190±30
	ssDNA(4mer)	100	90±10	90±20
Km [§]	molde/iniciador [†] , dATP	11,1±2,6	14,7±4,4	171±83

*Los números indican la concentración de dNTP (en nM) requerida para elongar de forma eficiente el iniciador de 15 mer hasta la posición de 20 mer.

[†]15mer/21mer molécula híbrida, excepto en los ensayos de Km que fue 15mer/29mer.

[‡]Los datos representan el porcentaje de actividad con respecto a la DNA polimerasa *wild-type* (100%) y la desviación estándar obtenida de al menos tres experimentos independientes.

[§]K_m: Constante de Michaelis Menten para la incorporación del nucleótido entrante (en nM). Los datos muestran la media y la desviación estándar correspondientes a cuatro medidas independientes.

En conjunto, estos resultados mostraron la importancia del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, no solo durante la incorporación del primer nucleótido sino también en la translocación del extremo iniciador desde el sitio de inserción hasta el sitio de elongación para permitir la entrada del siguiente nucleótido.

2.3. Mutaciones en el residuo Lys529 afectan a la unión de moléculas de DNA con estructura molde/iniciador en el centro activo de polimerización

La afinidad por las moléculas de DNA con estructura molde/iniciador de la DNA polimerasa *wild-type* y los mutantes se estudió mediante ensayos de retraso en gel utilizando como sustrato la molécula híbrida marcada sp1/sp1c+6 (15mer/21mer), tal y como se describe en Materiales y Métodos. En estas condiciones la DNA polimerasa *wild-type* produce una única banda retrasada cuya intensidad depende de la cantidad de polimerasa utilizada y que corresponde a la formación de un complejo estable DNA polimerasa/DNA en el centro activo de polimerización (Méndez *et al.*, 1994). Como se observa en la Figura 24, los mutantes mostraron una eficiencia de unión dos veces inferior con respecto a la DNA polimerasa *wild-type*. Por lo tanto, la deficiente incorporación de nucleótidos exhibida por los mutantes correlacionaría con su reducida capacidad para estabilizar la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización.

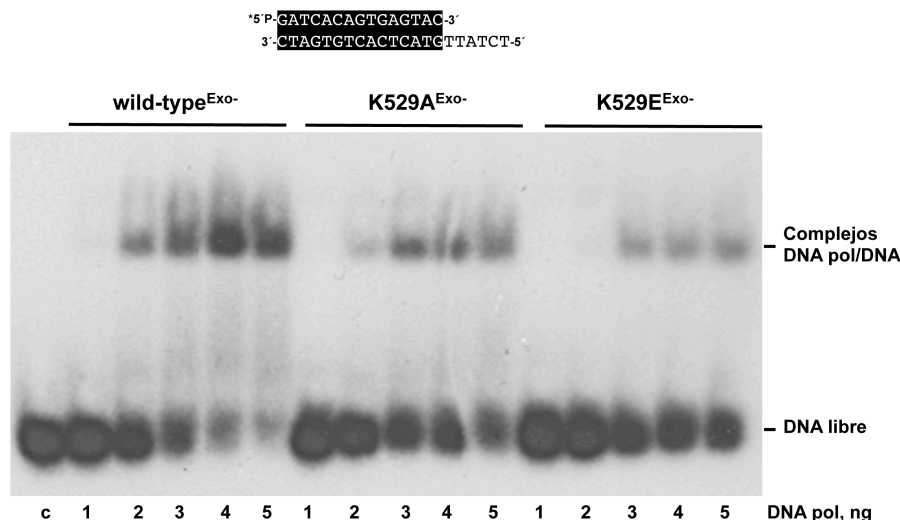


Figura 24: Ensayos de retraso en gel. El sustrato utilizado fue la molécula híbrida 15mer/21mer marcada radiativamente en 5' tal y como se muestra en la figura. La DNA polimerasa indicada, *wild-type* o mutante, carente de actividad exonucleasa 3'-5', se incubó con 0,7 nM del dsDNA marcado radiativamente en su extremo 5' durante 5 minutos a 4 °C, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Tras una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, la movilidad del DNA libre o del complejo DNA polimerasa/DNA se detectó mediante autorradiografía. El carril c corresponde a la movilidad del dsDNA en ausencia de DNA polimerasa.

2.4. Las mutaciones en la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 favorecen la transferencia de la cadena iniciadora hacia el centro activo exonucleasa 3'-5'

Las DNA polimerasas mutantes presentaron mayor actividad exonucleasa que la DNA polimerasa *wild-type* en los ensayos de balance Exo/pol. Decidimos estudiar esta actividad exonucleasa 3'-5' analizando la degradación del oligonucleótido de banda doble sp1/sp1c+6 en función del tiempo (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 25 y en la Tabla III, los mutantes presentaron cuatro veces más actividad exonucleasa que la DNA polimerasa *wild-type*.

Para continuar estudiando la actividad exonucleasa de los mutantes, analizamos la degradación del sustrato 30/36 mer (molde/iniciador) marcado radiativamente en su extremo 5' en condiciones en las que el único efecto observable fuera debido a las moléculas de DNA polimerasa que permanecen unidas al DNA marcado. Estas condiciones se consiguen preincubando la DNA polimerasa con el DNA en ausencia de metal activador (para evitar la degradación) y añadiendo simultáneamente al comienzo de la reacción el metal y un exceso de DNA no marcado que sirve como "trampa" (exceso de 100 veces del sustrato no marcado) para las moléculas que se encuentran libres, permitiendo el análisis de la degradación exonucleolítica de un solo evento de unión.

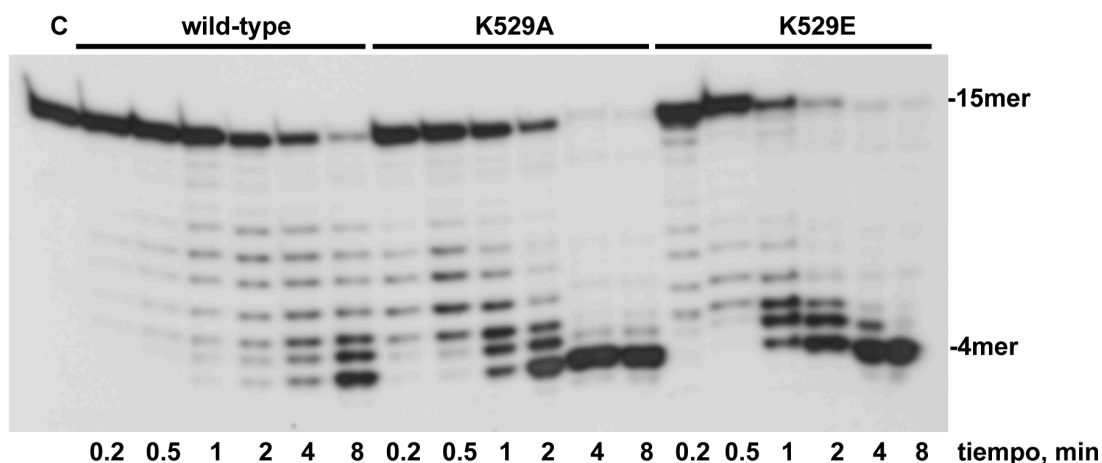


Figura 25: Actividad exonucleasa 3'-5' de los mutantes K529A y K529E sobre dsDNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 1,2 nM de la molécula híbrida 15mer/21mer marcada radiactivamente en 5' y 12 nM de la DNA polimerasa indicada. Después de incubar a 25 °C durante el tiempo indicado, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. C: Control de DNA.

Como se observa en la Figura 26, la cantidad de trampa utilizada en el ensayo fue suficiente para atrapar a todas las moléculas de DNA polimerasa, ya que cuando la trampa se añade al mismo tiempo que el dsDNA marcado a la mezcla de reacción, no se observa degradación del sustrato marcado (carril C; control de la trampa). Cuando se adicionó el metal y la trampa a la DNA polimerasa *wild-type* preincubada con el sustrato marcado (ver Materiales y Métodos), ésta produjo varios productos intermedios de degradación de 19 a 25 mer, en los tiempos mas cortos de reacción (Figura 26). Este patrón se interpreta como pausas durante la digestión exonucleolítica del DNA que ocurren sin la disociación de la enzima, ya que a tiempos mayores de reacción estos productos intermedios fueron progresivamente acortados. Sin embargo, los mutantes K529A y K529E no dieron lugar a estas paradas intermedias, obteniéndose una mayor tasa de degradación. Estos resultados indican que la Lys529 podría estar actuando como barrera para prevenir el exceso de degradación de los sustratos y regulando la actividad exonucleasa de la enzima.

Todos estos resultados sugieren que la estabilización defectiva del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización de los mutantes K529A y K529E podría favorecer la degradación exonucleolítica del sustrato dsDNA. En dichas condiciones existe una competición entre los dos modos de unión del extremo iniciador: para la degradación exonucleolítica la unión al centro activo 3'-5' exonucleasa debe superar la estabilización del centro de polimerización, que está contribuida principalmente por el apareamiento Watson y Crick y ligandos del DNA.

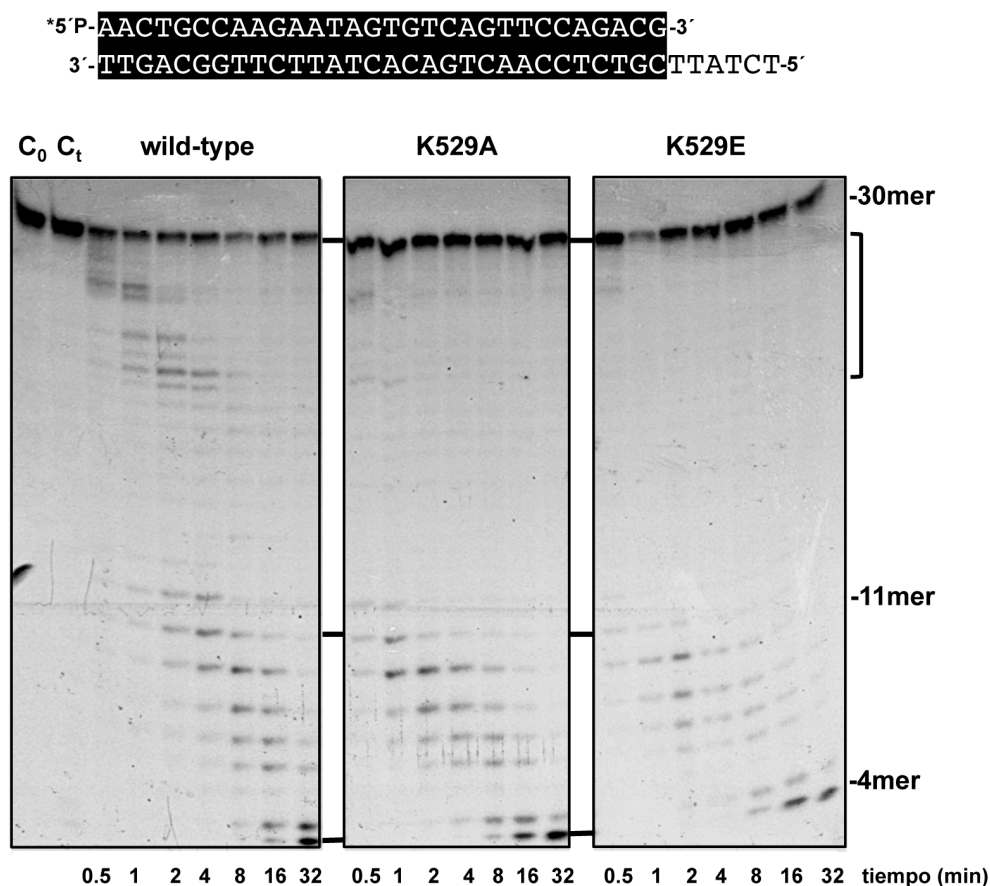


Figura 26: Actividad exonucleasa 3'-5' de los mutantes K529A y K529E en condiciones de un único evento de unión. El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos, en presencia de 12 nM de la DNA polimerasa indicada y 0,36 nM del sustrato molde/iniciador 30mer/36mer marcado en 5' que aparece en la parte superior de la figura. El asterisco indica que la cadena iniciadora está marcada radiactivamente en su extremo 5' con ^{32}P . La reacción exonucleolítica se inició con la adición del metal activador (10 mM MgCl_2) y con un exceso de 100 veces del sustrato no marcado como DNA trampa (0,36 μM). Tras la incubación a 25 °C durante los tiempos indicados, la reacción se paró con la adición de 10 mM EDTA y las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%-8 M urea y mediante su posterior autorradiografía. C₀: Control de DNA. C_t: Control de la trampa. La DNA polimerasa se preincubó con un exceso de 100 veces del sustrato no marcado como trampa de DNA.

Cuando se realizaron estudios de la actividad exonucleasa 3'-5' en función del tiempo usando como sustrato DNA de banda simple (oligonucleótido 15mer marcado en su extremo 5'), la actividad exonucleolítica de los mutantes con respecto a la DNA polimerasa *wild-type* fue menor que la obtenida utilizando como sustrato dsDNA (Figura 27), aunque continuó siendo 2,9 y 2,3 veces mayor en los mutantes K529A y K529E, respectivamente, en comparación con la enzima *wild-type* (Tabla III). Esto podría indicar que el ssDNA sigue el mismo camino que la cadena iniciadora hacia el centro activo de exonucleolisis y que la Lys529 establece contactos con este sustrato para limitar su degradación.

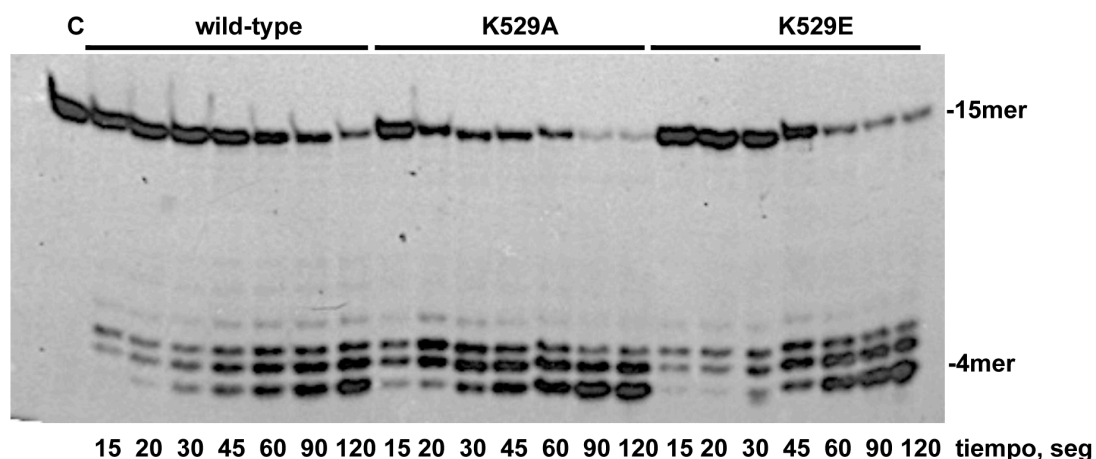


Figura 27: Actividad exonucleasa 3'-5' de los mutantes K529A y K529E sobre ssDNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 1,2 nM del oligonucleótido 15mer marcado radiactivamente en su extremo 5' y 12 nM de la DNA polimerasa indicada. Después de incubar a 25 °C durante el tiempo indicado, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. C: Control de DNA.

Para evaluar si el plegamiento del centro activo exonucleasa podría ser responsable de la elevada actividad exonucleasa exhibida por los mutantes, se analizó su capacidad de hidrolizar 5'-*p*-nitrofenil éster de timida 5' monofosfato (*p*NP-TMP). El *p*NP-TMP (Figura 28) es un sustrato no canónico de pequeño tamaño cuya hidrólisis depende únicamente de su accesibilidad al centro activo de exonucleolisis y de la actividad de los residuos catalíticos de éste. Utilizando este sustrato se elimina la influencia que podrían ejercer las interacciones que se establecerían con una cadena polinucleotídica y los ligandos de ssDNA del entorno del centro activo de exonucleolisis (Hamdan *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004). La hidrólisis del *p*NP-TMP a *p*-nitrofenol (*p*NP) y timidina monofosfato (TMP) puede ser monitorizada espectrofotométricamente midiendo la formación del *p*NP a una longitud de onda de 420 nm y a una temperatura de 25 °C. La reacción es dependiente de metal e inhibida por el producto de la reacción TMP. La zona lineal de producción de *p*NP se obtuvo en el intervalo de tiempo 5-100 segundos. El valor de la pendiente, obtenido por métodos de regresión lineal, permitió calcular la eficiencia catalítica de la reacción (s^{-1}). Como se observa en la Figura 29, ambas DNA polimerasas mutantes fueron capaces de hidrolizar este sustrato con una eficacia catalítica de $0,32 s^{-1}$, muy similar a la obtenida para la DNA polimerasa *wild-type* ($0,28 s^{-1}$). Estos resultados nos permiten concluir que no existen cambios en el centro exonucleasa de estos mutantes que pudieran ser los responsables de la mayor eficiencia exonucleolítica.

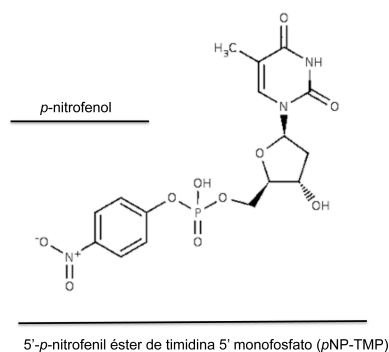


Figura 28: Estructura del 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5' monofosfato (*p*NP-TMP).

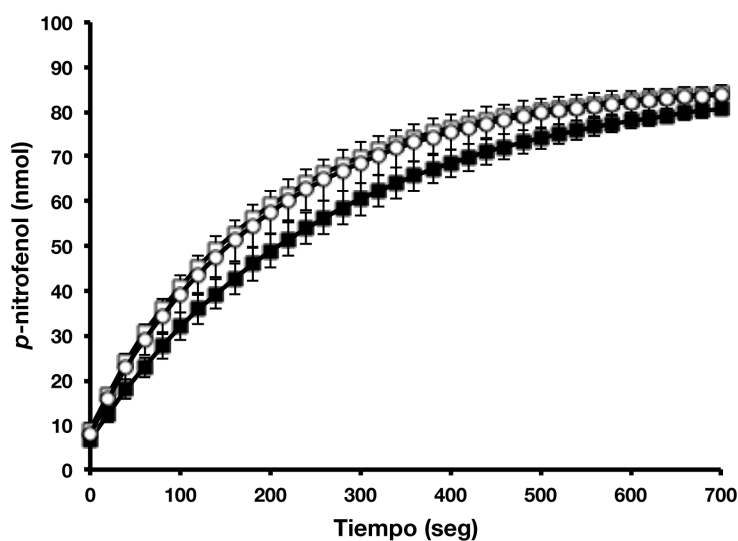


Figura 29: Hidrólisis del 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5' monofosfato. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 1 mM MnCl_2 , 3 mM *p*NP-TMP y 500 nM de la DNA polimerasa indicada. La hidrólisis se estudió monitorizando espectrofotométricamente a 420 nm la producción de *p*NP que fue representado frente al tiempo y los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados usando el software Kaleidagraph 3.6.4. La DNA polimerasa *wild-type* se representa mediante cuadrados negros y los mutantes K529A y K529E mediante cuadrados y círculos blancos, respectivamente.

Considerando la localización de la Lys529 en el subdominio *palm* del dominio de polimerización, a la degradación de sustratos cortos no le debería afectar las mutaciones introducidas en la Lys529, ya que la interacción DNA polimerasa/DNA dependerá solo de residuos específicos localizados cerca del centro activo de exonucleólisis. Así, como podemos observar en la Figura 30 y en la Tabla III, mientras que los mutantes de la DNA polimerasa continuaron siendo casi dos veces más activos que la enzima *wild-type* en la degradación del sustrato 5mer, su actividad relativa disminuyó hasta valores *wild-type* cuando se usó un sustrato de menor longitud (4mer).

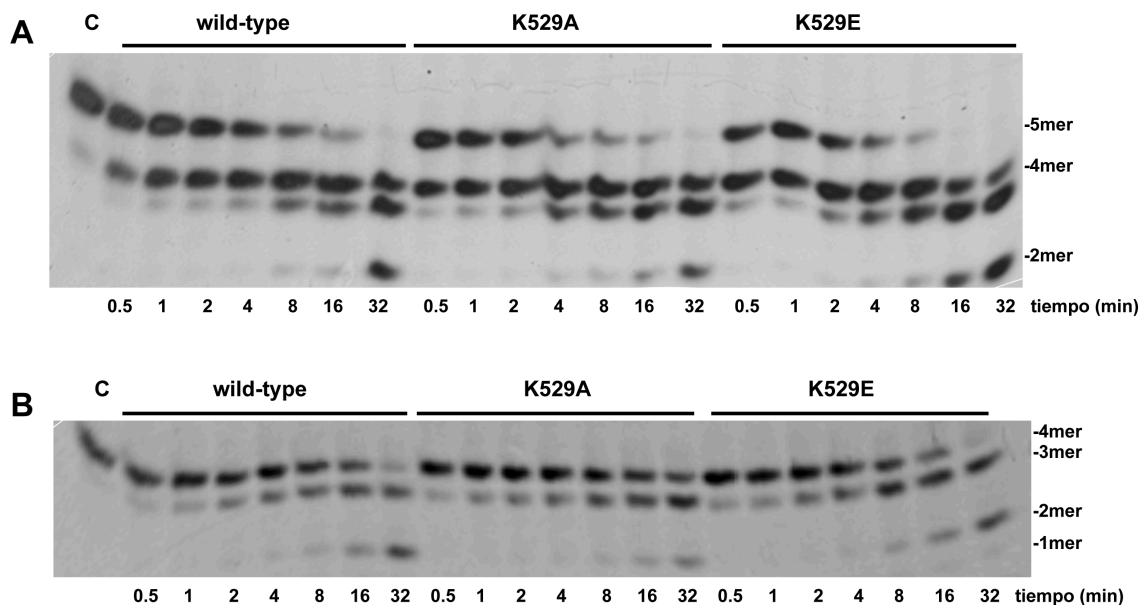


Figura 30: Degradación exonucleolítica de sustratos de menor longitud. El ensayo se realizó como está descrito en Materiales y Métodos, en presencia de 12 nM de la DNA polimerasa indicada, 10 mM $MgCl_2$ y utilizando como sustrato 14,5 nM del oligonucleótido 5 mer GATCA (A) o 18 nM del de 4 mer GATC (B) marcados radiactivamente en su extremo 5' con ^{32}P . Tras la incubación a 25 °C durante los tiempos indicados, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. La posición de los diferentes productos intermedios de la degradación está indicada a la derecha. C: Control de DNA.

Como se ha descrito anteriormente, la DNA polimerasa de $\phi 29$ es capaz de acoplar el desplazamiento de banda a la síntesis procesiva de DNA en ausencia de proteínas accesorias (Blanco *et al.*, 1989). Para determinar si las DNA polimerasas mutantes eran capaces de acoplar el desplazamiento de la banda que no está siendo copiada a la polimerización se estudió la replicación del DNA circular de cadena sencilla del bacteriófago M13 hibridado a un oligonucleótido de 17 mer (*primer* universal) cuyo extremo 3'-OH es utilizado por la DNA polimerasa como iniciador de la replicación. La primera ronda de replicación no requiere desplazamiento de banda, pero una vez completada la DNA polimerasa se encuentra con el extremo 5' de la cadena iniciadora, necesitando acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento del DNA recién sintetizado para poder continuar con la replicación del DNA. Por lo tanto, la aparición de productos de tamaño mayor a la unidad (7 kb), completado en la primera ronda de replicación, indicarán que la síntesis ha continuado acoplada al desplazamiento de banda.

Como se observa en la Figura 31 el mutante K529A fue capaz de replicar este sustrato, aunque con una eficiencia catalítica menor a la mostrada por la enzima *wild-type*. Este mutante es capaz de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda. Sin embargo, el mutante K529E no fue capaz de elongar el oligonucleótido hibridado y por lo tanto no podemos evaluar su capacidad de desplazamiento de banda.

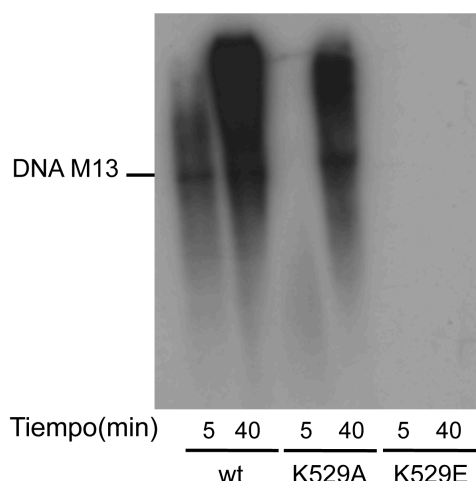


Figura 31: Desplazamiento de banda acoplado a la replicación del DNA de M13 por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. La replicación del DNA de M13 se llevó a cabo tal y como se explica en Materiales y Métodos en presencia de 40 μ M dNTPS y 60 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Tras la incubación a los tiempos indicados a 30 °C, la longitud de los productos sintetizados fue analizado por electroforesis en gel de agarosa alcalino. La posición de la molécula unidad se indica a la izquierda.

2.5. Papel de la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 durante los primeros pasos de la replicación del TP-DNA

Como se ha descrito, la replicación del TP-DNA de ϕ 29 implica la iniciación en ambos orígenes de replicación, una actividad especial de la DNA polimerasa de ϕ 29 que cataliza la formación del complejo TP-dAMP dirigida por molde. Para estudiar la actividad de iniciación de las polimerasas mutantes, se evaluó la formación del complejo TP-dAMP utilizando como molde TP-DNA. Como se muestra en la Figura 32 y Tabla IV, las polimerasas mutantes fueron dos (K529A) y cuatro (K529E) veces menos eficientes que la enzima *wild-type*.

Para comprobar si esta disminución en la formación del TP-dAMP se debía a defectos en la interacción con la TP, realizamos ensayos de ultracentrifugación en gradiente de glicerol. En las condiciones ensayadas, ambos mutantes están formando un heterodímero estable con la TP (Figura 32B), lo que indica que el defecto no se encuentra en la interacción con la TP.

El impedimento mostrado por los mutantes a la hora de catalizar la reacción de iniciación nos llevó a analizar contactos potenciales entre el residuo Lys529 de la polimerasa y la TP. La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar *et al.*, 2006) muestra como el dominio iniciador de la TP ocupa el mismo sitio en la DNA polimerasa que el DNA durante su elongación.

Aunque el *priming-loop* de la TP presenta una conformación desordenada en la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP, el grupo OH del residuo iniciador Ser232 ha de localizarse en una posición análoga a la ocupada por el 3'-OH del DNA en el complejo binario. Por lo tanto, el residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 podría estar interaccionando con el residuo Glu233 de la TP. Este glutámico que está conservado en las TPs de fagos relacionados con ϕ 29, como se muestra en la Figura 22B, podría mimetizar el último enlace fosfodiéster del extremo 3' de la cadena iniciadora del DNA. Por lo tanto, la baja capacidad de formación del TP-dAMP mostrada por los mutantes podría deberse o bien a la

ausencia de interacción (K529A) o a una repulsión electrostática (K529E) con el residuo Glu233 de la TP.

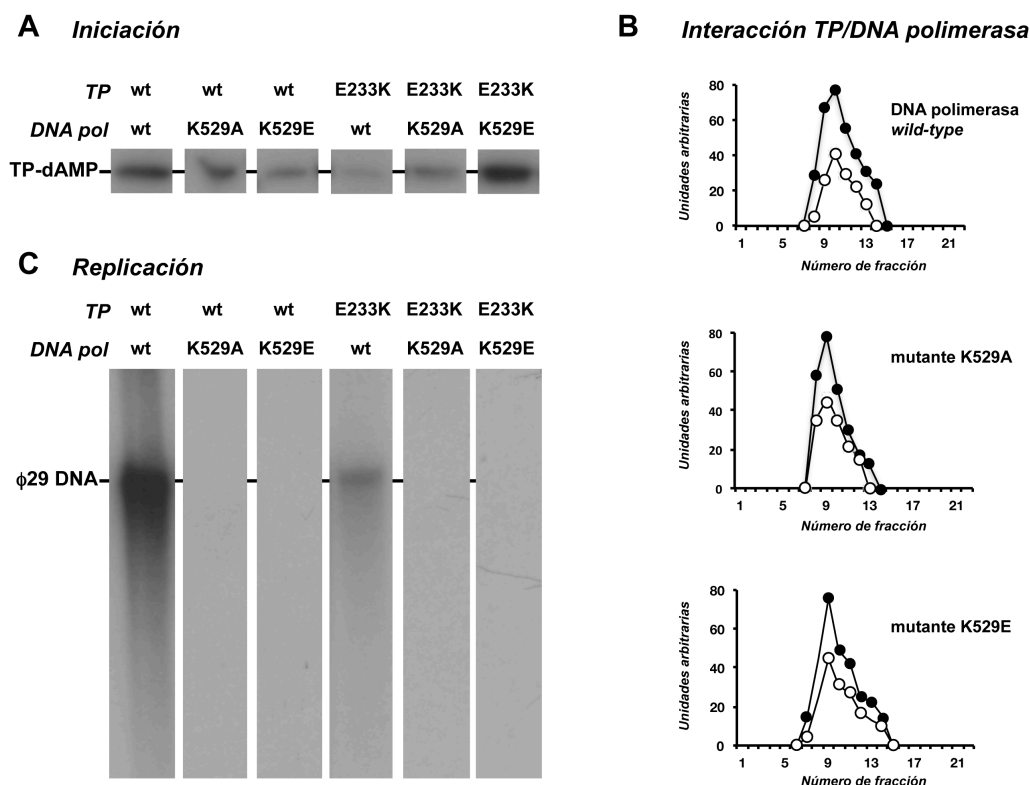


Figura 32: Iniciación y replicación del TP-DNA de ϕ 29 por los mutantes de la Lys529 de la DNA polimerasa. (A) Formación *in vitro* del complejo TP-dAMP. El ensayo de iniciación se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o mutante, 13 nM DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 1,6 nM del TP-DNA de ϕ 29 y 10 mM $MgCl_2$. Tras cuatro minutos de incubación a 30 °C, la reacción fue detenida, procesada y analizada en geles de poliácridamida al 12% y autorradiografiados. La posición del TP-dAMP está indicada. (B) Análisis de la interacción DNA polimerasa/TP mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol. El ensayo se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos, preincubando 0,6 μ M de la TP *wild-type* y 0,6 μ M de la DNA polimerasa *wild-type* o mutante durante 30 minutos a 4 °C. Tras la incubación las muestras se cargaron en un gradiente continuo del 15-30% de glicerol en presencia de 0,2 M NaCl. Después de la centrifugación, las fracciones recogidas se sometieron a electroforesis en geles de poliácridamida al 12% y después fueron teñidos con SYPRO. La cuantificación densitométrica, expresada en unidades arbitrarias, de DNA polimerasa (círculos negros) o de TP (círculos blancos) está representada frente al número de fracción. (C) Replicación del TP-DNA. El ensayo se realizó como se explica en Materiales y Métodos, en presencia de 13 nM de la DNA polimerasa *wild-type* o del mutante indicado, 13 nM de la TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM del TP-DNA de ϕ 29 y 10 mM $MgCl_2$. Tras 10 minutos de incubación a 30 °C, se calculó la actividad relativa, y la longitud del DNA sintetizado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa alcalina.

Para examinar esta posibilidad, decidimos mutar el Glu233 de la TP a Lys para introducir una carga positiva que debería restaurar la interacción con la DNA polimerasa mutante K529E. El mutante de la TP se sobreexpresó y purificó como se indica en Materiales y Métodos. Evaluando su capacidad para formar el complejo TP-dAMP (Figura 32A), observamos que presentaba defectos en su formación tanto con la DNA polimerasa *wild-type* como con el mutante K529A. Sin embargo, el heterodímero E233K(TP)/K529E(DNA

polimerasa) presentó una eficiencia *wild-type* en la iniciación, sugiriendo que el residuo Lys529 de la DNA polimerasa interacciona con el Glu233 de la TP durante los primeros pasos de la replicación del TP-DNA. Esta interacción garantizaría la correcta orientación y estabilización del residuo iniciador de la Ser232 en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa.

2.6. Los mutantes de la DNA polimerasa son incapaces de realizar correctamente la transición de iniciación con TP a elongación con DNA

Una vez catalizada la formación del producto de iniciación TP-dAMP, la misma DNA polimerasa continúa con la elongación del DNA de manera procesiva y mediante un mecanismo de desplazamiento de banda. Como se esperaba, las mutaciones en el residuo Lys529 impiden a la polimerasa realizar la replicación del TP-DNA, a pesar de los valores de iniciación obtenidos tanto con la TP *wild-type* y mutantes (Figura 32). En contraste, la capacidad de replicación del heterodímero formado por la DNA polimerasa *wild-type* y el mutante de TP E233K fue consistente con su nivel de iniciación (Tabla IV), sugiriendo que el residuo Glu233 de la TP no está jugando un papel fundamental en la replicación más allá de la iniciación.

Tabla IV. Actividades de la DNA polimerasa de $\phi 29$ usando como iniciadoras la TP *wild-type* y mutantes.

DNA polimerasa	Proteína Terminal	Actividad ensayada*	
		Formación del TP-dAMP	Replicación del TP-DNA
<i>wild-type</i>	<i>wild-type</i>	100	100
K529A	<i>wild-type</i>	56 \pm 20	0,6 \pm 0,3
K529E	<i>wild-type</i>	27 \pm 9	0,2 \pm 0,1
<i>wild-type</i>	E233K	24 \pm 6	14 \pm 5
K529A	E233K	41 \pm 12	1 \pm 0,1
K529E	E233K	123 \pm 36	0,4 \pm 0,2

*Los datos representan el porcentaje de actividad del heterodímero mutante con respecto al de la *wild-type* (100%) y la desviación estándar obtenida por al menos tres experimentos independientes.

Después de que la iniciación haya tenido lugar, no hay una disociación inmediata del heterodímero DNA polimerasa/TP. Una vez que el décimo nucleótido es incorporado, la interacción entre las dos proteínas se rompe para permitir que la DNA polimerasa continúe con la replicación (Méndez *et al.*, 1997). Para analizar esta etapa de transición, los productos obtenidos en presencia de tres dNTPs (sin dCTP) se analizaron en un gel de electroforesis de alta resolución. Para una mejor detección de los complejos de iniciación no elongados y de los productos parcialmente elongados, se utilizaron las DNA polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 3'-5' para prevenir la degradación de dichos productos.

Como se muestra en la Figura 33, en el caso del heterodímero *wild-type* se obtuvieron las bandas de iniciación TP(dAMP)₁₋₂ y los intermedios de transición TP(dNMP)₄₋₆, descritos como moléculas abortadas en la transición entre la iniciación con TP y la elongación con DNA (Méndez *et al.*, 1997), así como el producto TP(dNMP)₈ que corresponde a la elongación

truncada desde el origen derecho del TP-DNA. A pesar de los bajos niveles de iniciación exhibidos por el mutante de la TP E233K, la proporción entre los productos de elongación y los complejos de iniciación [TP-(dNMP)₄₋₈]/ [TP-(dAMP)₁₋₂], fue similar a la obtenida con la TP *wild-type*, de acuerdo con un papel del Glu233 de la TP restringido a la etapa de iniciación. Sin embargo, las mutaciones en la Lys529 dificultan a la DNA polimerasa a progresar más allá de la formación de los productos de iniciación TP-(dAMP)₁₋₂ (Figura 33) a pesar de sus niveles de iniciación tanto con la TP *wild-type* como con la mutante E233K.

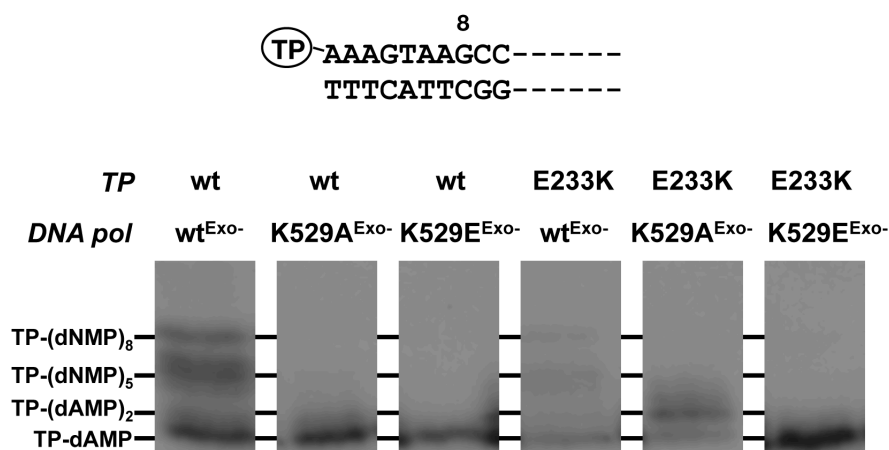


Figura 33: Análisis de los productos de transición de la replicación del DNA de ϕ 29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 13 nM de la DNA polimerasa indicada, 13 nM de la TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM del TP-DNA de ϕ 29, 10 mM MgCl₂ y 5 μ M de dATP, dGTP y dTTP. Tras la incubación durante 5 minutos a 30 °C, los distintos productos de la transición se detectaron en geles de poliacrilamida al 12% de alta resolución. Los primeros diez nucleótidos del origen derecho del genoma de ϕ 29 están representados en la parte superior de la figura. Los productos intermedios obtenidos durante los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de ϕ 29 están indicados.

Se ha descrito que una vez que la DNA polimerasa cataliza la formación del TP-dAMP frente a la segunda timina en 3' (Méndez *et al.*, 1992), se transloca una posición hacia atrás para recuperar la información del molde correspondiente al primer nucleótido en 3', mediante un mecanismo denominado *sliding-back*. Se evaluó la capacidad de los mutantes de recuperar la información aportada por el primer nucleótido de la cadena molde mediante un ensayo de replicación en presencia de dATP, dGTP y ddTTP como se describe en Materiales y Métodos. Como podemos observar en la Figura 34, el mutante de la TP E233K es capaz de recuperar la información correspondiente al primer nucleótido y realizar correctamente el *sliding-back*, tal y como se esperaba por su comportamiento en los experimentos de transición. Sin embargo, cuando se ensayaron los mutantes de la DNA polimerasa, observamos otra vez que las mutaciones en la Lys529 dificultan a la DNA polimerasa a progresar más allá de la formación de los productos de iniciación TP-(dAMP)₁₋₂, siendo esta situación especialmente dramática en

el caso del mutante K529E que solamente fue capaz de incorporar el primer nucleótido para después quedarse bloqueado.

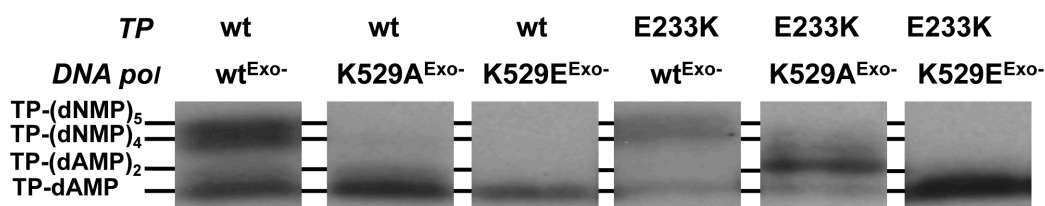
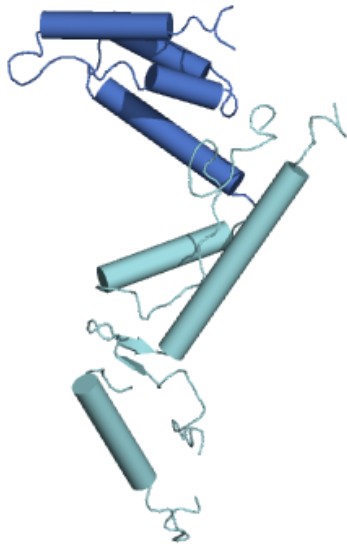


Figura 34: Análisis del *sliding-back*. Recuperación del nucleótido del extremo 3'. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 13 nM de la DNA polimerasa indicada, 13 nM de la TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM del TP-DNA de $\phi 29$, 10 mM $MgCl_2$ y 5 μM de dATP, dGTP y 500 μM de ddTTP. Tras la incubación durante 5 minutos a 30 °C, los distintos productos de la transición se detectaron mediante geles de alta resolución de poliacrilamida al 12%. Los distintos productos obtenidos [TP-dAMP, TP-(dAMP)₂, TP-(dNMP)₄ y TP-(dNMP)₅] están indicados.

Los resultados mostrados en este capítulo indicaron como la sustitución del residuo Lys529 de la DNA polimerasa decrece la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización y como consecuencia la inserción del nucleótido entrante cuando se utiliza como iniciador tanto DNA como TP. Asimismo, la mutación K529E inhibe el paso de la translocación durante la síntesis del DNA. Además, la combinación de los mutantes de la DNA polimerasa con un mutante de la TP en el residuo Glu233, vecino del residuo iniciador Ser232 nos permite inferir un contacto directo entre ambos residuos, siendo requerido para garantizar una adecuada iniciación de la replicación del TP-DNA. Los resultados son compatibles con la unión secuencial del residuo Lys529 de la DNA polimerasa con la TP y posteriormente con el DNA durante la replicación del TP-DNA (ver Discusión).



Capítulo III:

Implicación de la TP parental y del dominio iniciador de la TP del heterodímero en el reconocimiento de la posición de iniciación en la replicación.

3. Implicación de la TP parental y del dominio iniciador de la TP del heterodímero en el reconocimiento de la posición de iniciación en la replicación

Como se ha descrito anteriormente, el bacteriófago $\phi 29$ es el modelo más estudiado de replicación de genomas con TP. En los organismos que contienen una TP covalentemente unida a los extremos de sus genomas, la iniciación de la replicación está dirigida por posiciones internas de la cadena molde (Salas, 1991; Salas *et al.*, 1996). Así, la DNA polimerasa de $\phi 29$ utiliza el grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP (residuo iniciador) para catalizar la adición del primer nucleótido (dAMP) en la reacción de iniciación (Blanco y Salas, 1984; Hermoso *et al.*, 1985). Esta reacción está dirigida por el segundo nucleótido en 3' de la cadena molde (la segunda T del extremo 3' terminal: 3' TTT) (Méndez *et al.*, 1992).

En el caso de GA-1 la reacción de iniciación también está dirigida por la segunda posición del molde (Illana *et al.*, 1996). Sin embargo, otros virus como Nf o Cp-1 inician usando como molde el tercer nucleótido en 3' (Longás *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 1996) o el cuarto nucleótido como ocurre en PRD1 (Caldentey *et al.*, 1993) y adenovirus (King y van der Vliet, 1994).

3.1. Papel de la TP parental de $\phi 29$ en el reconocimiento del primer nucleótido usado como molde en la reacción de iniciación

La determinación de que la reacción de iniciación ocurre usando como molde el segundo nucleótido en 3' se llevó a cabo mediante el uso de oligonucleótidos de banda simple que contenían la secuencia de los orígenes de replicación (Méndez *et al.*, 1992), así como con fragmentos de DNA sin la TP que contenían las secuencias terminales de $\phi 29$ (González-Huici *et al.*, 2000b). Sin embargo, estos sustratos no permitían estudiar la influencia de la TP parental en la posición del molde que dirige la reacción de iniciación. Para estudiar esta posibilidad, el TP-DNA de $\phi 29$ fue digerido parcialmente con la actividad exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa Vent, lo que dio lugar a regiones de banda simple con TP. Los orígenes de replicación fueron reconstituidos mediante la hibridación de oligonucleótidos de 29mer que contenían la secuencia *wild-type* del origen de replicación derecho [ori (29) Phi29] o sustituciones en la primera (T1A), segunda (T2A) y tercera (T3A) timina a alanina, tal y como se detalla en el esquema de la Figura 35. Estas moléculas híbridas, a las que denominamos DNA reconstituido se utilizaron como sustrato en la reacción de iniciación.

Como se observa en la Figura 36A, realizamos ensayos de formación del producto de iniciación TP-dAMP, en presencia de $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP, con la DNA polimerasa deficiente en actividad exonucleasa D12A/D66A, que previene la degradación exonucleolítica del molde de ssDNA (Bernad *et al.*, 1989) y usando como sustrato oligonucleótidos de DNA de banda simple 29mer con la secuencia del origen de replicación del extremo derecho de $\phi 29$ y variantes de éste

en las tres primeras timinas. En estas condiciones, con los oligonucleótidos T1A y T3A se obtuvo formación de TP-dAMP, pero se observó una disminución en la actividad de iniciación cuando el heterodímero utilizó como molde el oligonucleótido T2A, de acuerdo con los resultados que mostraban que reacción de iniciación en $\phi 29$ está dirigida por el segundo nucleótido en 3' (Méndez *et al.*, 1992).



Figura 35: Obtención del DNA reconstituido. (A) Representación esquemática de la obtención del DNA reconstituido. El TP-DNA de $\phi 29$ está representado con una TP unida a cada uno de sus extremos 3'. El primer paso, tal y como se describe en Materiales y Métodos, es la degradación de los extremos 3', después el producto de la degradación se hibrida con oligonucleótidos 29mer con la secuencia del origen de replicación derecho de $\phi 29$ o modificaciones de este en sus tres primeras timinas en 3'. (B) Secuencia de los oligonucleótidos con la secuencia del origen de replicación derecho de $\phi 29$ y variantes de las tres primeras timinas en 3' utilizados en los ensayos. Las timinas cambiadas a adenina están indicadas en negrita.

El mismo ensayo se realizó usando como molde el DNA reconstituido, y los resultados obtenidos fueron esencialmente los mismos, ya que tal y como se muestra en la Figura 36B, la formación de TP-dAMP solo disminuyó en presencia del origen T2A reconstituido. Para estar seguros de que los niveles de iniciación obtenidos se debían al DNA reconstituido y no a posibles oligonucleótidos no hibridados o TP-DNA no degradado, se llevó a cabo la misma reacción pero usando como molde la concentración de oligonucleótido utilizada en la hibridación (carril O) y el TP-DNA degradado pero sin hibridar (carril D). También se utilizó un TP-DNA al que se le sometió al proceso de obtención del DNA reconstituido, pero sin degradarlo con Vent y sin hibridarlo, para ver en qué medida los cambios de temperatura afectarían a su actividad. Como se muestra en el carril C, la formación de TP-dAMP en este caso disminuyó, pero mantuvo un 55% de su actividad. Estos resultados indican que la TP parental no está jugando un papel esencial en dictar el nucleótido interno usado como molde en la reacción de iniciación.

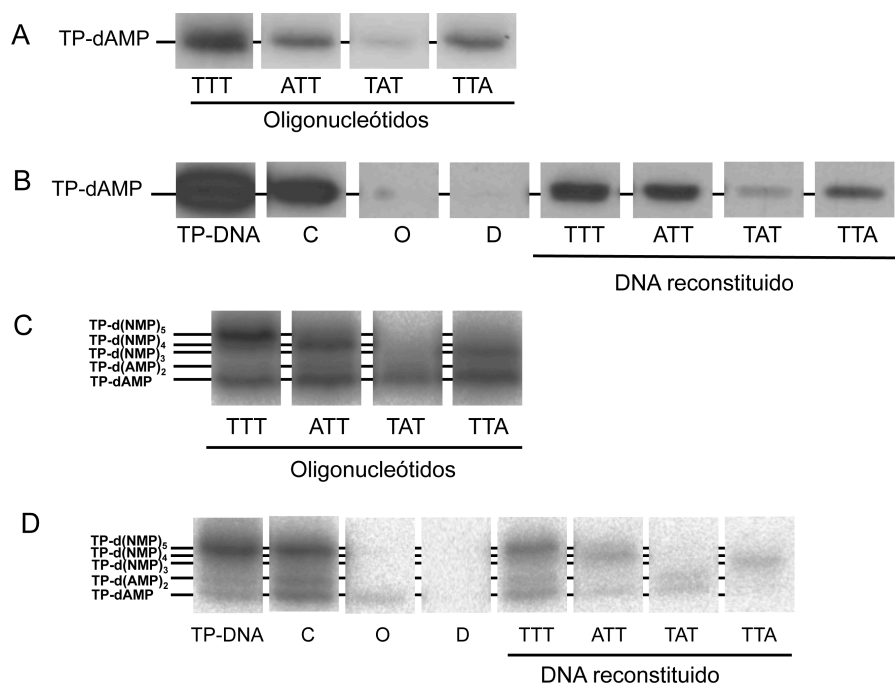


Figura 36: Formación del producto de iniciación TP-dAMP y análisis del mecanismo de *sliding-back* utilizando como molde ssDNA y DNA reconstituido. Los ensayos se llevaron a cabo esencialmente como se describe en Materiales y Métodos. **(A y B)** Formación de TP-dAMP en presencia de 130 nM de TP, 60 nM de DNA polimerasa sin actividad exonucleasa D12A/D66A (Bernad *et al.*, 1989), 1 mM $MnCl_2$ y 2 μM del oligonucleótido de banda simple indicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 12° C **(A)** o en presencia de 13 nM TP, 13 nM del mutante de DNA polimerasa D12A/D66A, 1mM $MnCl_2$ y 0,4 nM del DNA reconstituido, durante 30 minutos a 30 °C **(B)**. La movilidad del complejo TP-dAMP está indicada. **(C y D)** Ensayos de sliding-back utilizando como molde 2 μM oligonucleótidos de banda simple **(C)** o 0,4 nM de DNA reconstituido **(D)**. Ambos ensayos se realizaron en presencia de 160 nM TP, 60 nM de la DNA polimerasa D12A/D66A y 1 mM $MnCl_2$; en el primer caso las muestras se incubaron durante 1 hora a 12 °C, y en el segundo durante 30 minutos a 30 °C. El análisis se realizó en geles de alta resolución. La longitud de los diferentes productos está indicada a la izquierda. TP-DNA: TP-DNA sin degradar ni hibridar; C (control): TP-DNA sometido al mismo proceso que el DNA reconstituido pero sin utilizar la DNA polimerasa Vent en la fase de degradación y sin oligonucleótidos en la fase de hibridación; O (oligonucleótido): el ensayo se realizó con la misma cantidad de oligonucleótido utilizado en la fase de hibridación, pero sin TP-DNA; D (degradado): TP-DNA degradado pero no hibridado.

Como se ha mencionado anteriormente, una vez que se ha producido la iniciación frente al segundo nucleótido en 3', la DNA polimerasa se transloca una posición hacia atrás para recuperar la información del primer nucleótido en 3' en un mecanismo llamado *sliding-back*. Para estudiar la posible implicación de la TP parental en el mecanismo de *sliding-back*, comparamos los primeros productos de síntesis obtenidos usando como sustrato ssDNA con los obtenidos usando los orígenes reconstituidos (Figura 36C y Figura 36D). Esta elongación truncada se realizó en presencia de dATP, dGTP y ddTTP, por lo que en estas condiciones se permite que la elongación progrese únicamente hasta la primera A del molde, quedando bloqueada tras la incorporación de ddTMP. Así, la DNA polimerasa iniciará usando como molde la segunda T en 3' y el TP-dAMP formado será translocado una posición hacia atrás para aparearse con la primera T. Por tanto, hay una recuperación de la información del primer

nucleótido del molde seguida de elongación hasta que la polimerasa llega a la primera A del molde, que aparece en la quinta posición (3' TTTCAT), e inserta el ddTMP, siendo el producto de elongación máximo TP-(dNMP)₅. Tanto en presencia de oligonucleótidos como del DNA reconstituido, la sustitución del primer nucleótido del molde (T1A) da lugar a un producto de cuatro nucleótidos de longitud, TP-(dNMP)₄ (Figura 36C y Figura 36D) ya que la ausencia de la última timina en 3' previene el *sliding-back*, y el producto obtenido se debe a una elongación directa tras la formación del TP-dAMP, produciéndose la pérdida del nucleótido terminal. Mientras que la sustitución del segundo nucleótido en 3' (T2A) dio lugar al producto TP-dAMP cuando se usaron oligonucleótidos como molde, la presencia de la TP paterna dio lugar a un producto de dos nucleótidos de longitud. El cambio T2A previene la iniciación frente al segundo nucleótido en 3' y posiblemente está forzando que la iniciación ocurra frente al tercer nucleótido (como está descrito). La TP podría favorecer que en esta circunstancia el complejo TP-dAMP realice un *jumping-back* a la primera posición del molde con la posterior inserción del ddTMP frente a la adenina del molde (González-Huici *et al.*, 2000a).

Con los dos tipos de sustratos, cuando la sustitución ocurre en el tercer nucleótido (T3A) se obtuvo un producto de tres nucleótidos de longitud, ya que la DNA polimerasa es capaz de iniciar en la segunda T en 3', hacer el *sliding-back* recuperando la información del primer nucleótido y después incorporar el ddTMP frente a la adenina de la tercera posición. Estos resultados sugieren que la TP parental no parece estar jugando un papel esencial en el mecanismo de *sliding-back*.

3.2. Implicación de las hélices del dominio iniciador en dictar el nucleótido interno en 3' usado como molde en la reacción de iniciación

Nf es un fago relacionado con $\phi 29$ que replica su genoma utilizando una proteína como iniciador (González-Huici *et al.*, 2000a; Longás *et al.*, 2006). A diferencia de lo que ocurre en $\phi 29$, en Nf la iniciación está dirigida por la tercera timina en 3' del molde y la recuperación de los dos nucleótidos terminales se produce principalmente mediante un mecanismo de *stepwise sliding-back* (Longás *et al.*, 2008). Como puede verse en la Figura 37, el alineamiento de las TPs de $\phi 29$ y Nf muestra un alto grado de identidad de secuencia entre ambas proteínas (62,4%). Basados en esta identidad de secuencia, estudios previos realizados con quimeras en las que se intercambió el dominio iniciador de las TPs de $\phi 29$ y Nf mostraron que el dominio iniciador de la TP es el principal determinante estructural encargado de reconocer la posición interna que se utiliza como molde en la reacción de iniciación ya que el intercambio de este dominio provocó cambios en la especificidad por la posición de iniciación (Longás *et al.*, 2008).

El dominio iniciador de la TP de $\phi 29$ (residuos del 173 al 266) está formado por cuatro hélices α y en él se encuentra el residuo iniciador, la Ser232, que proporciona el grupo hidroxilo necesario para que la DNA polimerasa inicie la síntesis del DNA. Presenta un carácter

electronegativo y contacta con los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa. La primera hélice comprende los residuos del 174-191, la segunda del 199 al 208, la tercera del 214 al 223 y la cuarta del 238 al 250. Para evaluar si alguna de estas cuatro hélices es la responsable de dictar la posición del molde usada para dirigir la reacción de iniciación construimos TP's quiméricas en las que cambiamos individualmente cada una de estas hélices de $\phi 29$ por las correspondientes de Nf. Así, obtuvimos tres quimeras de la TP de $\phi 29$ que contenían parte de las hélices de Nf: Phi29NfH1 que contenía los residuos del 188 al 192 de la primera hélice del dominio iniciador de la TP de Nf; Phi29NfH3 con los residuos del 213 al 225 de la tercera hélice del dominio iniciador de la TP de Nf y Phi29NfH4 (realizado por Elisa Longás) que contenía los residuos del 235 al 248 de la cuarta hélice del dominio iniciador de la TP de Nf (ver Figura 37). La segunda hélice de la TP de $\phi 29$ no se cambió ya que es muy similar a la hélice correspondiente en Nf. La quimera Phi29NfH4 resultó ser inactiva por lo que los ensayos se realizaron con Phi29NfH1 y Phi29NfH3.

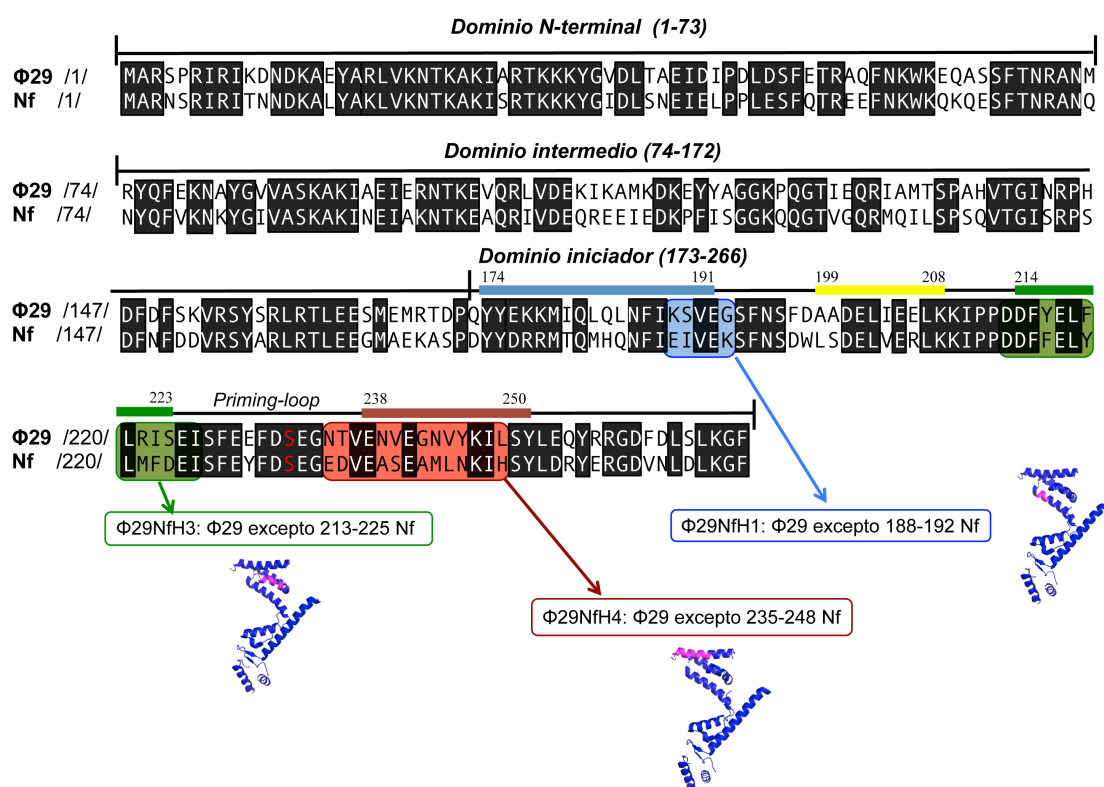


Figura 37: Alineamiento de secuencia de las TP's de $\phi 29$ y Nf. Representación de las quimeras de TP construidas. Los números entre barras indican la posición relativa de los aminoácidos con respecto al N-terminal de cada TP. Los residuos iguales en ambas TP's están representados con letras blancas sobre un fondo negro. Las serinas iniciadoras están marcadas en rojo. Las hélices del dominio iniciador se indican sobre la secuencia del alineamiento en cilindros de color azul, amarillo, verde y rojo de acuerdo a lo publicado en Kamtekar *et al.* (2006). Los residuos intercambiados están en un círculo del color correspondiente a la hélice a la que pertenecen. Las quimeras obtenidas se representan con los residuos cambiados en rosa. Los números de acceso para las TP's son los siguientes: $\phi 29$ (número de acceso del UniProtKB P03681), Nf (número de acceso del GenBank ACH57070.1).

Ensayamos la función iniciadora de las TP quiméricas usando TP-DNA de $\phi 29$ como molde. En estas condiciones, y como se muestra en la Figura 38A y en la Tabla V, cuando la DNA polimerasa utilizó como iniciadora a la quimera Phi29NfH1, los niveles de iniciación fueron incluso mayores que cuando usó la TP *wild-type*, a diferencia de la utilización de la quimera Phi29NfH3 que afectó moderadamente la formación del TP-dAMP.

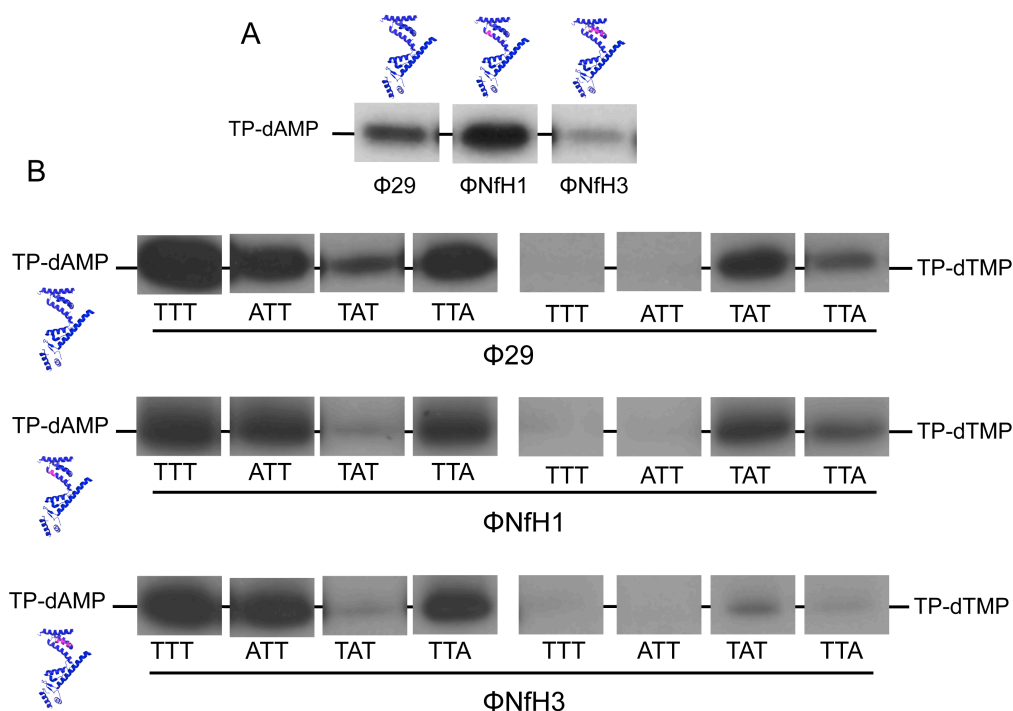


Figura 38: Formación de los productos de iniciación TP-dAMP y TP-dTMP usando como molde TP-DNA y ssDNA. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Iniciación con TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o quimera, 13 nM de DNA polimerasa, 1.6 nM del TP-DNA de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. Tras 10 minutos de incubación a 30 °C las muestras fueron paradas, procesadas y analizadas en gel de poliacrilamida-SDS para su posterior autorradiografía. La posición del complejo TP-dAMP está indicada. **(B)** Formación de los complejos de iniciación *in vitro* sobre ssDNA. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 130 nM de TP *wild-type* o quimera, 60 nM de la DNA polimerasa D12A/D66A deficiente en actividad exonucleasa, 2 μ M del oligonucleótido indicado y 1 mM $MnCl_2$. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 12 °C (excepto Phi29NfH1 que se incubó durante 15 minutos). Se utilizaron como nucleótidos marcados dATP y dTTP. La posición del TP-dAMP o TP-dTMP está indicada.

Determinamos si el cambio de hélices por las correspondientes de Nf había afectado a la especificidad por la posición de iniciación. Por tanto, para determinar cual de las timinas en 3' del molde dirige la reacción de iniciación cuando las quimeras son usadas como iniciadoras, utilizamos oligonucleótidos de banda simple 29mer con la secuencia del origen derecho de replicación de $\phi 29$ y variantes de ésta que incluyen cambios en las tres primeras adeninas en 3' del molde, tal y como se explicó anteriormente. Los ensayos se realizaron utilizando como nucleótido marcado tanto dATP como dTTP, por lo que en la reacción de iniciación se obtuvo como producto TP-dAMP (Figura 38B, panel izquierdo) o TP-dTMP (Figura 38B, panel

derecho). Con respecto a la formación de TP-dAMP, se observó una disminución en la iniciación cuando el oligonucleótido utilizado fue T2A, con cualquiera de las TPs tanto la *wild-type* como las quimeras. De la misma manera, se observó obtención del producto TP-dTMP principalmente con el oligonucleótido T2A y en menor medida con el T3A, con las tres TPs ensayadas. Estos resultados indican que ninguna de las hélices sustituidas confieren especificidad en la reacción de iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, ya que la DNA polimerasa sigue iniciando principalmente frente a la segunda timina en 3', tal y como ocurre con la TP *wild-type* de $\phi 29$.

También estudiamos si alguna de estas hélices podría estar jugando un papel en los siguientes pasos de la replicación. Como ya se ha comentado anteriormente, una vez que la DNA polimerasa cataliza la formación del TP-dAMP, la misma polimerasa continúa con la elongación de manera procesiva y mediante un mecanismo de desplazamiento de banda hasta completar la longitud total del TP-DNA. Cuando la DNA polimerasa usó como iniciadora la quimera Phi29NfH1, la replicación disminuyó 2,5 veces con respecto a la TP *wild-type*, obteniéndose unos niveles sorprendentemente bajos, en comparación con sus niveles de iniciación (Figura 39A y Tabla V), mientras que en el caso de Phi29NfH3 fueron acordes con la formación de TP-dAMP.

Tabla V. Funciones de las TP *wild-type* y mutantes de $\phi 29$

$\phi 29$ TP	Formación de TP-dAMP ^a	Replicación de TP-DNA ^b	Amplificación de TP-DNA ^c	Transición de TP-DNA ^d
<i>wild-type</i>	100	100	100	1
$\Phi 29NfH1$	160 \pm 5	40 \pm 5	18 \pm 6	0,3 \pm 0,1
$\Phi 29NfH3$	61 \pm 7	50 \pm 10	15 \pm 6	1 \pm 0,4
E229Y	153 \pm 37	107 \pm 4	44 \pm 2	2 \pm 0,6
E228F/F230V	16 \pm 8	8 \pm 6	2 \pm 1	<1

Los datos representan el valor medio y la desviación estándar obtenida de al menos tres experimentos independientes.

^aFormación del TP-dAMP usando $\phi 29$ TP-DNA como molde de la reacción.

^{a,b,c}Los números indican la actividad de las TP mutantes con respecto a la TP *wild-type*.

^dLa eficiencia de la transición fue calculada como la proporción entre los productos TP-(dNMP)₃₋₁₄/TP-(dNMP)₁₋₂ considerando tal cociente 1 en el caso de la TP *wild-type*. Ver detalles en el texto principal. En el caso del mutante E228F/F230V la única banda detectable fue la del producto de iniciación TP-dAMP, por lo que la eficiencia de la transición fue <1.

En los ensayos de amplificación, realizados en presencia de las cantidades adecuadas de DNA polimerasa, TP, DBP y SSB, se puede amplificar hasta en tres órdenes de magnitud una cantidad limitante de TP-DNA inicial (Blanco *et al.*, 1994). Ambas quimeras fueron ineficientes en la reacción de amplificación (Figura 39B y Tabla V). Estos ensayos son más sensibles para detectar defectos en cualquiera de los pasos de la replicación ya que un leve defecto en cualquier etapa será a su vez amplificado.

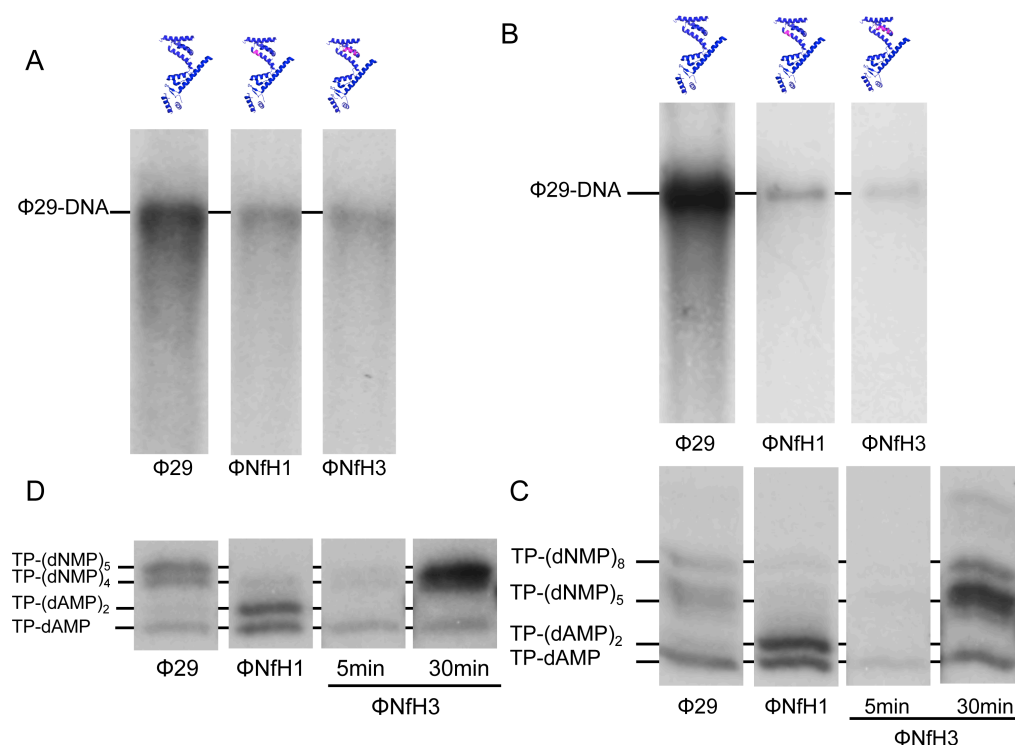


Figura 39: Replicación y elongación truncada del TP-DNA de $\phi 29$. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Replicación del TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o quimera, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. La incubación se realizó durante 10 minutos a 30 °C; la longitud del DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina. **(B)** Amplificación del TP-DNA con TP *wild-type* y quiméricas. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 31 pM de TP-DNA, 6,5 nM de DNA polimerasa, 6,5 nM de TP *wild-type* o quimérica, 30 μM de SSB, 35 μM de DBP de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. Tras 40 minutos de incubación a 30 °C, la reacción se paró con 10 mM EDTA, la longitud y cantidad de DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina y su posterior autorradiografía. **(C)** Análisis de los productos de transición de la replicación del DNA de $\phi 29$. El ensayo se realizó en presencia de 160 nM de TP *wild-type* o quimera, 1,6 nM de TP-DNA, 60 nM de la DNA polimerasa deficiente en actividad exonucleasa D12A/D66A, 5 μM de dATP, dGTP y dTTP y 10 mM $MgCl_2$. Tras la incubación durante 5 minutos a 30 °C, los diferentes productos de transición fueron analizados en geles de alta resolución. Para detectar los productos de transición obtenidos cuando se usó la quimera Phi29NfH3, se realizó el mismo experimento pero con una incubación de 30 minutos. **(D)** Análisis del *sliding-back*. La reacción se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones descritas para los ensayos de transición, pero en presencia de 5 μM de dATP, dGTP y 500 μM de ddTTP. En el caso de Phi29NfH3 la incubación también se llevó a cabo durante 30 minutos.

En los ensayos de transición la proporción de productos intermedios [TP-(dNMP)₃₋₁₄] con respecto a los productos de iniciación [TP-(dNMP)₁₋₂] cuando se utilizó la quimera Phi29NfH3 fue similar a la obtenida con la TP *wild-type*. Por el contrario cuando la quimera Phi29NfH1 se usó como iniciadora, dicha replicación fue tres veces menor que la obtenida con la TP *wild-type*, quedando la replicación principalmente bloqueada tras la inserción de 1-2 moléculas de dAMP, lo que explica sus bajos niveles de replicación en contraste con su alta actividad en iniciación (Figura 39C y Tabla V). Por lo tanto, aunque esta hélice no tenga un papel esencial en la reacción de iniciación, si parece ser crítica en permitir la progresión del producto de iniciación. Además, en los ensayos de *sliding-back* realizados en presencia de

dATP, dGTP y ddTTP, la mayoría de los productos obtenidos cuando se usó como iniciadora Phi29NfH1 correspondieron a los productos TP-(dNMP)₁₋₂ (Figura 39D), en contraste a la quimera Phi29NfH3 y a la TP *wild-type* con los que sí se alcanzó la quinta posición.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de *sliding-back*, nos preguntamos si el último nucleótido en 3' es recuperado durante los primeros pasos de la replicación y si las paradas observadas en Phi29NfH1 son un fallo en el mecanismo de *sliding-back* o un problema en la posterior elongación. Para contestar a esta pregunta, la elongación del complejo TP-dAMP se estudió en presencia de dATP, dGTP, dTTP y ddCTP (que ha de insertarse en la posición 12, ver Figura 35), usando como molde oligonucleótidos de banda simple que contenían la secuencia del origen de replicación derecho de ϕ 29. Usando el heterodímero *wild-type*, la máxima longitud del producto de replicación obtenido fue TP-(dNMP)₁₂ (Figura 40A), tal y como se esperaba. Los mismos resultados se obtuvieron usando como iniciadoras las quimeras Phi29NfH1 y Phi29NfH3, lo que nos permite concluir que las hélices cambiadas no impiden la recuperación del primer nucleótido en 3' del molde. Fue inesperado que la quimera Phi29NfH1 permitiera a la DNA polimerasa alcanzar la posición 12, a diferencia de lo que ocurría cuando se utilizó TP-DNA como molde (ver arriba).

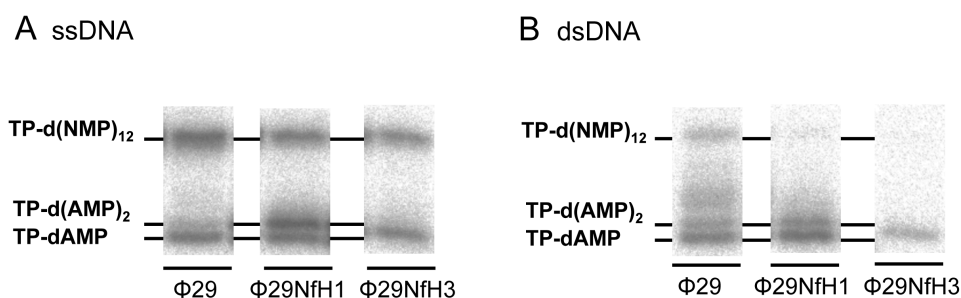


Figura 40: Elongación truncada de los oligonucleótidos de banda simple (A) y de banda doble (B) con la secuencia correspondiente al extremo derecho del DNA de ϕ 29. La reacción se llevó a cabo en presencia de 160 nM de TP *wild-type*, quimera o mutante, 60 nM de la DNA polimerasa D12A/D66A deficiente en actividad exonucleasa, 0,4 μ M del oligonucleótido indicado de banda simple o doble, 5 μ M de dATP, dGTP y dTTP, 500 μ M de ddCTP y 1 mM $MnCl_2$. Tras la incubación a 12 °C (ssDNA) o 30 °C (dsDNA) durante 15 minutos, las muestras se pararon y se analizaron en geles de alta resolución (360 x 280 x 0.5 mm).

La diferencia entre estos moldes es la banda doble y la presencia de la TP parental. Por este motivo, realizamos ensayos de elongación truncada usando como molde oligonucleótidos de banda doble. Como puede verse en la Figura 40B, ninguna de las TPs quiméricas permitió a la DNA polimerasa progresar más allá de la posición 2 cuando se utilizó dsDNA como molde. Estos experimentos sugieren que la DNA polimerasa con estas quimeras presenta defectos en el desplazamiento de la banda no-molde.

3.3. Papel de la posición de los residuos aromáticos del *priming-loop* de la TP en dictar la posición del nucleótido en 3' usada como molde durante la reacción de iniciación

El *priming-loop* de la TP de $\phi 29$ está formado por los residuos del 227 al 233. Se localiza al final del dominio iniciador, entre las dos últimas hélices α y su estructura en la resolución cristalográfica es desordenada (Kamtekar *et al.*, 2006). El residuo iniciador, la Ser232, que proporciona el grupo hidroxilo para la síntesis del DNA, se encuentra en este *loop* y debe colocarse en el centro activo de polimerización en una orientación correcta para servir de iniciador a la DNA polimerasa en la formación del producto de iniciación (TP-dAMP). La superposición de las estructuras cristalográficas de la DNA polimerasa de $\phi 29$ unida al DNA o a la TP sugirió que esta región podría contactar con el extremo 3' del molde. El alineamiento del *priming-loop* de TPs de diferentes virus que inician la replicación de sus genomas con una TP, mostró la presencia en todos ellos de residuos aromáticos próximos al residuo iniciador, tal y como se observa en la Figura 41A. Además, parece que cuanto mayor es la distancia del residuo aromático, la posición de iniciación es más interna. Así, en GA-1 la iniciación de la replicación ocurre principalmente frente al segundo nucleótido en 3' del molde, aunque el tercer nucleótido puede ser utilizado como sitio alternativo en la iniciación (Illana *et al.*, 1996). El residuo aromático en GA-1 está localizado, como en $\phi 29$, dos posiciones antes del residuo iniciador. En el fago de *Streptococcus pneumoniae*, Cp-1, la replicación del DNA está dirigida por el tercer nucleótido del molde (Martín *et al.*, 1996), como ocurre en Nf (Longás *et al.*, 2008). En el fago de *E. coli* PRD1 es el cuarto nucleótido en 3' el que dirige la reacción de iniciación (Caldentey *et al.*, 1993). En Cp-1 y PRD1 el residuo aromático se encuentra a tres posiciones de distancia del residuo iniciador. En Nf, hay dos residuos aromáticos, a dos y tres posiciones de la serina iniciadora. En adenovirus, la replicación ocurre frente al cuarto nucleótido en 3' del molde (King y van der Vliet, 1994) y el residuo aromático está a cuatro posiciones del residuo iniciador. Por ello es tentador especular que el residuo aromático pueda estar limitando la introducción de la cadena molde en el centro activo de polimerización, condicionando la posición de iniciación, como se muestra en la Figura 41B. Así, la posición de iniciación sería tanto más interna cuanto mayor fuera la distancia del grupo aromático al residuo iniciador.

Para estudiar esta hipótesis y comprobar el posible papel de estos residuos aromáticos en dictar el nucleótido en 3' del molde durante la reacción de iniciación, mutagenizamos la región el *priming-loop* de la TP de $\phi 29$. Así, obtuvimos dos TPs mutantes: E229Y y E228F/F230V (ver Figura 41A). En E229Y cambiamos el Glu229 a tirosina. Este glutámico es la única diferencia entre el *priming-loop* de $\phi 29$ y Nf, por lo que con este mutante obtuvimos la TP de $\phi 29$ con el *priming-loop* de Nf. En E228F/F230V el Glu228 se cambió a fenilalanina y la Phe230 se cambió a valina. El resultado de estos cambios fue un mutante de la TP de $\phi 29$ en el que el residuo aromático se ha alejado dos posiciones (hacia el N-terminal) del residuo iniciador,

situándose por tanto a cuatro posiciones de distancia de la serina iniciadora. La mutagénesis dirigida de estos mutantes la realizó Elisa Longás.

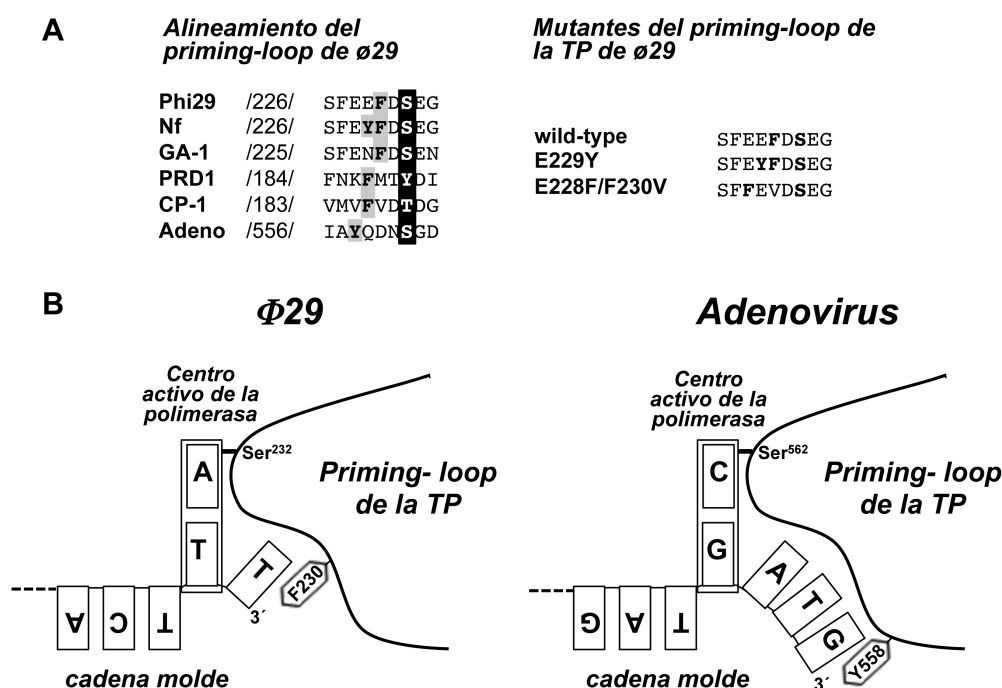


Figura 41: (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del *priming-loop* de diferentes virus que inician la replicación con proteína terminal. Los números entre barras indican la posición relativa de los aminoácidos con respecto al N-terminal de cada TP. El residuo iniciador de los distintos virus aparece en letras blancas sobre un fondo negro. El residuo aromático se representa con letras negras sobre un fondo gris. **Mutantes del *priming-loop* de la TP.** Mutantes E229Y y E228F/F230V del *priming-loop* de la TP de $\phi 29$. La serina iniciadora y los residuos aromáticos aparecen representados con letras negras. Los números de acceso para las TP son los siguientes: $\phi 29$ (número de acceso del UniProtKB P03681), Nf (número de acceso del GenBank ACH57070.1), GA-1 (referencia de la secuencia del NCBI NP073686.1), PRD1 (GenBank AAA32449.1), Cp-1 (secuencia de referencia del NCBI NP044816.1) y adenovirus (GenBank AAA92208.1). **(B) Representación esquemática de la posición del extremo 3' en el centro activo de polimerización de $\phi 29$ y adenovirus.** El primer nucleótido que se usa como molde y el residuo aromático están indicados.

Para determinar si el cambio en la posición de los residuos aromáticos cambia la especificidad de la iniciación, se realizaron ensayos de iniciación con oligonucleótidos de banda simple con la secuencia del extremo derecho del genoma de $\phi 29$ con variaciones en las tres primeras timinas del extremo 3', tal y como se ha explicado anteriormente. Los ensayos se realizaron utilizando como nucleótido marcado tanto dATP como dTTP, obteniéndose como producto de la reacción TP-dAMP (panel izquierdo) o TP-dTMP (panel derecho) (Figura 42). Usando la TP *wild-type* como iniciadora, se observó una disminución en la formación de TP-dAMP cuando el oligonucleótido utilizado fue T2A; sin embargo, cuando se usaron los mutantes no se observó esta disminución. En cuanto a la formación de TP-dTMP con la TP *wild-type* se observó principalmente con el oligonucleótido T2A, y en menor medida con T3A; sin embargo, con los mutantes E229Y y E228F/F230V la formación de TP-dTMP ocurrió

principalmente cuando se usó de molde el oligonucleótido T3A, y en menor medida con el T2A (Figura 42). Por lo tanto, en los mutantes la reacción de iniciación ocurre fundamentalmente frente al tercer nucleótido en 3', como ocurre con la TP de Nf (Longás *et al.*, 2008).

Estos resultados muestran que el aumento de la distancia entre el residuo aromático y el residuo iniciador, una (E229Y) o dos (E228F/F230V) posiciones resulta en una mayor eficiencia en la iniciación en una posición más interna (tercer en vez de segundo nucleótido en 3'), sugiriendo que la posición del residuo aromático en el *priming-loop* de la TP podría estar dictando la posición del molde utilizada para dirigir la reacción de iniciación de la replicación de $\phi 29$.

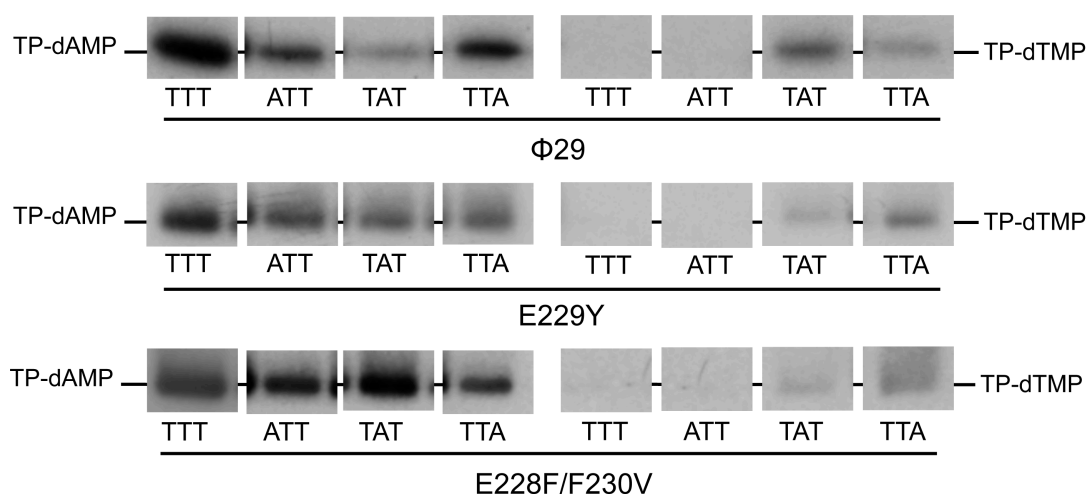


Figura 42: Formación de los complejos de iniciación *in vitro* con ssDNA. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 130 nM de TP wild-type o mutante, 60 nM de la DNA polimerasa D12A/D66A deficiente en actividad exonucleasa, 2 μ M del oligonucleótido indicado y 1 mM $MnCl_2$. Tras 1 hora de incubación a 12 °C las muestras se pararon con 10 mM EDTA. Se utilizaron como nucleótidos marcados dATP o dTTP. La posición del TP-dAMP o TP-dTMP está indicada.

Para estudiar la función iniciadora de los mutantes de la TP, evaluamos la formación del producto de iniciación TP-dAMP usando como molde el TP-DNA de $\phi 29$. Como se muestra en la Figura 43A y en la Tabla V, cuando la DNA polimerasa utilizó como iniciador al mutante E228F/F230V la formación de TP-dAMP estaba muy afectada, pero cuando se utilizó el mutante E229Y los niveles de iniciación fueron incluso mayores que con la TP *wild-type*. También evaluamos la capacidad de las TPs mutantes para llevar a cabo la replicación del TP-DNA y como se observa en la Figura 43B y en la Tabla V, los resultados fueron similares a los obtenidos para la reacción de iniciación. Así, el heterodímero formado por la DNA polimerasa y el mutante E229Y se comportó en replicación de manera similar a como lo hace el heterodímero *wild-type*, mientras que el mutante E228F/F230V estaba severamente afectado. Como se esperaba debido a sus bajos niveles de replicación e iniciación, la DNA polimerasa fue incapaz de realizar la reacción de amplificación del TP-DNA cuando utilizó como iniciador la TP

mutante E228F/F230V (Figura 43C). La TP mutante E229Y, a pesar de sus buenos niveles de iniciación y replicación, está afectado en la amplificación.

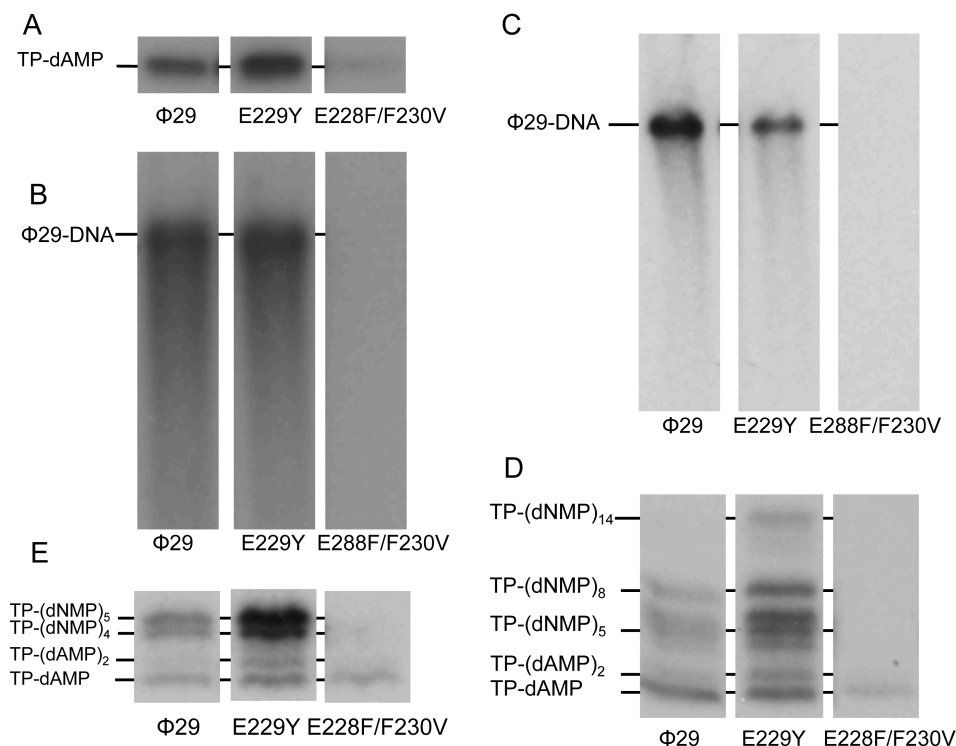


Figura 43: Replicación y elongación truncada del TP-DNA de $\phi 29$ con los mutantes de la TP E229Y y E228F/F230V. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Iniciación con TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de la TP *wild-type* o mutante, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. Las muestras se incubaron 10 minutos a 30 °C y después fueron paradas, procesadas y analizadas en gel para su posterior autorradiografía. La posición del complejo TP-dAMP está indicada. **(B)** Replicación del TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o mutante, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. Tras 10 minutos de incubación a 30 °C, la reacción se paró con 10 mM EDTA y la longitud del DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina. **(C)** Amplificación del TP-DNA con TP *wild-type* y mutantes. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 31 pM de TP-DNA, 6,5 nM de DNA polimerasa, 6,5 nM de la TP *wild-type* o quimérica, 30 μM de SSB de $\phi 29$, 35 μM de DBP de $\phi 29$ y 10 mM $MgCl_2$. Tras 40 minutos de incubación a 30 °C, la longitud y cantidad de DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina y su posterior autorradiografía. **(D)** Análisis de los productos de transición de la replicación del DNA de $\phi 29$. El ensayo se realizó en presencia de 160 nM de TP *wild-type* o mutantes, 1,6 nM de TP-DNA, 60 nM de la DNA polimerasa deficiente en actividad exonucleasa D12A/D66A, 5 μM de dATP, dGTP y dTTP y 10 mM $MgCl_2$. Las muestras se incubaron 5 minutos a 30 °C, y los diferentes productos de transición fueron analizados en geles de alta resolución. **(E)** Análisis del *sliding-back*. El ensayo se realizó esencialmente en las mismas condiciones descritas para los ensayos de transición, pero en presencia de 5 μM de dATP, dGTP y 500 μM de ddTTP.

Para ver cómo afectaban las mutaciones introducidas a la transición entre la iniciación con TP y la elongación con DNA polimerasa, realizamos ensayos de transición como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje entre los productos truncados [TP-(dNMP)₃₋₁₄] y los complejos de iniciación [TP-(dNMP)₁₋₂] fue mayor con el mutante E229Y que con la TP *wild-type*, siendo la eficiencia de la transición el doble en el mutante (ver Tabla V). En el caso

de la TP mutante E228F/F230V, la intensidad de las bandas fue muy baja, de acuerdo con sus bajos niveles de iniciación y replicación (Figura 43D).

Para estudiar el mecanismo de *sliding-back* cuando estos mutantes eran utilizados como iniciadores, se realizaron ensayos como se ha explicado anteriormente, en presencia de dATP, dGTP y ddTTP (Figura 43E). Cuando el mutante E229Y fue ensayado, todos los nucleótidos del molde fueron copiados, siendo la intensidad de la cuarta y la quinta bandas incluso mayor que la obtenida con la TP *wild-type*, de acuerdo con su elevada eficiencia en la transición. Sin embargo, con el mutante E228F/F230V solo se detectó la banda de iniciación, consecuente con sus bajos niveles de iniciación y replicación.

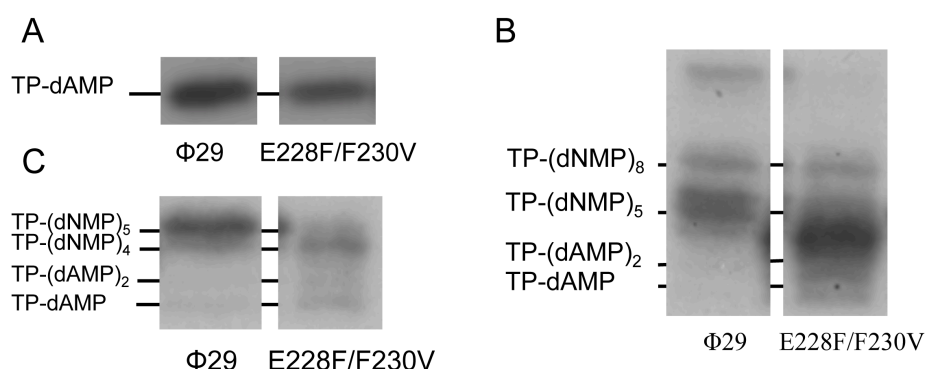
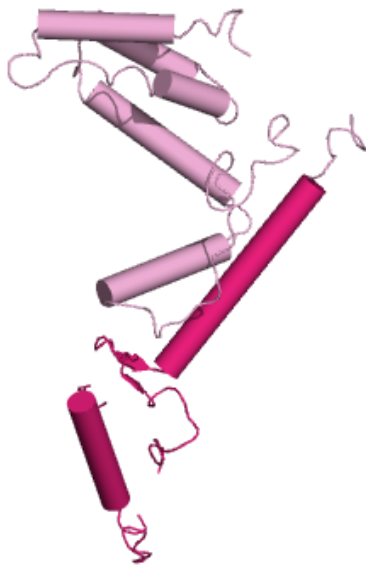


Figura 44: Iniciación y elongación truncada del TP-DNA de $\phi 29$ con el mutante E228F/F230V en presencia de Mn^{2+} . (A) Formación del producto de iniciación TP-dAMP. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o mutante, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA de $\phi 29$ y 1 mM $MnCl_2$. Las muestras se incubaron 10 minutos a 30 °C. (B) Análisis de los productos de transición de la replicación del DNA de $\phi 29$. El ensayo se realizó en presencia de 160 nM de TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM de TP-DNA, 60 nM de la DNA polimerasa deficiente en actividad exonucleasa D12A/D66A, 5 μM de dATP, dGTP y dTTP y 1 mM $MnCl_2$. Tras la incubación durante 5 minutos a 30 °C, los diferentes productos de transición fueron analizados en geles de alta resolución. (C) Análisis del *sliding-back*. La reacción se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones descritas para los ensayos de transición, pero en presencia de 5 μM de dATP, dGTP y 500 μM de ddTTP.

Los resultados obtenidos con el mutante E228F/F230V indicaron una menor eficiencia en la reacción de iniciación relativa a la TP *wild-type* cuando el molde usado fue TP-DNA (Figura 43) que cuando se utilizaron oligonucleótidos de banda simple (Figura 42). La principal diferencia en estos experimentos, además del sustrato utilizado, fue el metal usado como activador, magnesio en el caso del TP-DNA y manganeso con ssDNA. Para ver si los resultados podrían ser atribuibles al metal, repetimos los experimentos en los que el molde fue TP-DNA en las mismas condiciones, pero usando como metal manganeso en vez de magnesio (Figura 44). En estas condiciones, los niveles de iniciación cuando se usó de iniciador el mutante mejoraron (Figura 44A). El análisis de los productos de transición reveló que la DNA polimerasa sintetizó productos de transición más cortos cuando utilizó como iniciador el mutante E228F/F230V que cuando utilizó la TP *wild-type* (Figura 44B), de acuerdo con los ensayos de *sliding-back* donde

la DNA polimerasa no alcanzó los cinco nucleótidos de longitud, quedándose parada en la cuarta posición (Figura 44C), indicando que tras la iniciación frente al tercer nucleótido en 3', solamente ocurriría un evento de *sliding-back*. Estos resultados sugieren que los cambios en el residuo aromático en estas posiciones impedirían la realización del *sliding-back* del segundo al primer nucleótido del molde.



Capítulo IV:

Implicación del dominio N-terminal y de la primera hélice del dominio intermedio en el reconocimiento del origen de replicación

4. Implicación del dominio N-terminal y de la primera hélice del dominio intermedio en el reconocimiento del origen de replicación

La presencia de la TP parental, que está covalentemente unida a los extremos 5' de la cadena no molde, es la principal señal para que el heterodímero DNA polimerasa/TP reconozca el origen de replicación. Así, cuando se usaron como molde fragmentos de DNA que carecían de la TP, los niveles de iniciación disminuyeron de seis a diez veces con respecto a la actividad obtenida con TP-DNA (González-Huici *et al.*, 2000b; Gutiérrez *et al.*, 1986a).

Ensayos de iniciación realizados con sistemas heterólogos en los que la DNA polimerasa, la TP y el TP-DNA procedían de $\phi 29$ y Nf, mostraron mayores niveles de iniciación cuando la DNA polimerasa y el TP-DNA eran del mismo fago, indicando una interacción específica entre la DNA polimerasa y la TP parental (González-Huici *et al.*, 2000b). De acuerdo con estos resultados, estudios realizados con una DNA polimerasa quimérica de $\phi 29$ que contenía el subdominio TPR-1 de la DNA polimerasa de GA-1, mostraron que esta polimerasa quimérica es capaz de catalizar la reacción de iniciación usando como iniciadora la TP de GA-1 solamente en presencia del TP-DNA de $\phi 29$, indicando que la mayor contribución en el reconocimiento de la TP parental es llevado a cabo por la DNA polimerasa (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007).

Sin embargo, la TP del heterodímero también parece jugar un papel en la identificación de la TP paterna. Así, ensayos realizados con mutantes en los residuos Asn80, Try82 y Arg169 de la TP de $\phi 29$ mostraron su importancia en el reconocimiento del origen de replicación. Las mutaciones introducidas en estos residuos resultaron ser críticas cuando estaban presentes simultáneamente en la TP iniciadora y paterna, causando la inactivación del origen probablemente debido a la ausencia de interacciones entre las TP iniciadora y parental mutantes, afectando a la correcta interacción requerida para una reacción de iniciación funcional. Estos resultados apoyan la existencia de elementos de reconocimiento del origen de replicación de $\phi 29$ que implican interacciones complementarias entre la TP iniciadora y parental (del Prado *et al.*, 2012; Illana *et al.*, 1999). Además, los análisis de la secuencia de la TP mostraron que la región entre los aminoácidos del 84 al 118 podría formar una hélice anfipática que pudiera estar implicada en la interacción entre la TP paterna e iniciadora (Serna-Rico *et al.*, 2000).

4.1. Implicación de la primera hélice α del dominio intermedio de la TP en el reconocimiento del origen de replicación

Teniendo en cuenta los resultados anteriores (Serna-Rico *et al.*, 2000) analizamos en más profundidad el papel de esta hélice α en conferir especificidad a dicho reconocimiento, siendo probablemente necesaria la presencia de la misma hélice α en ambas, la TP paterna y la TP del heterodímero.

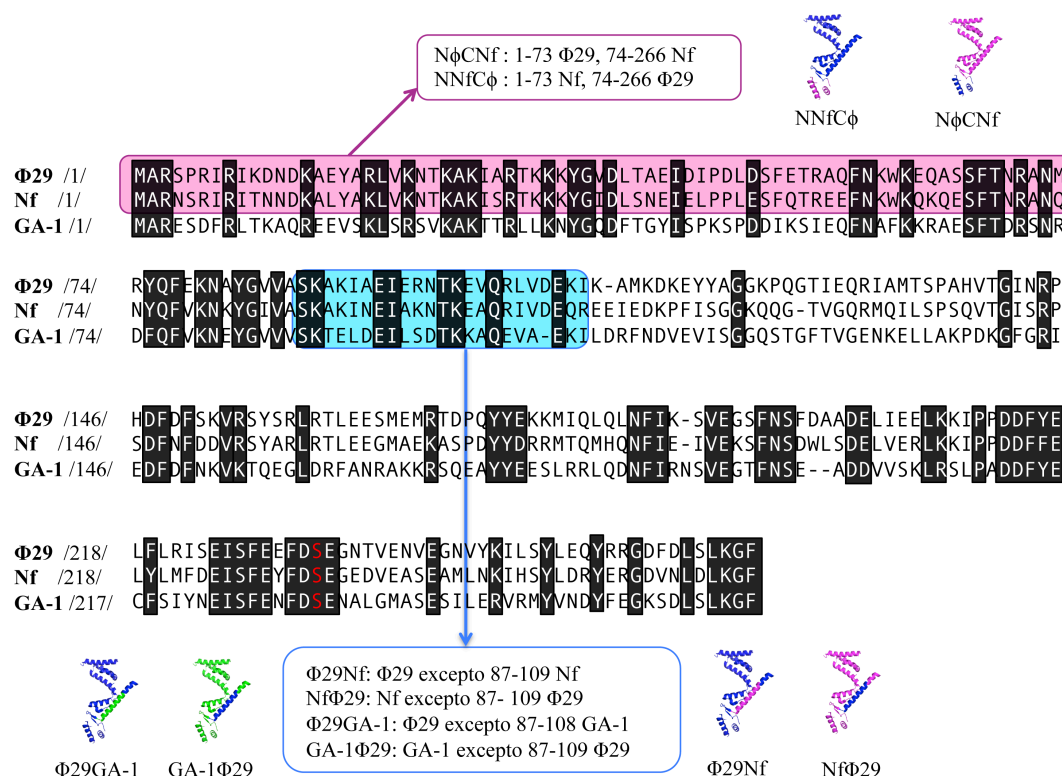


Figura 45: Alineamiento de secuencia de las TPs de ϕ 29, Nf y GA-1. Representación de las quimeras de TP construidas. Los números entre barras indican la posición relativa de los aminoácidos con respecto al N-terminal de cada TP. Los residuos iguales en las tres TPs están representados con letras blancas sobre un fondo negro. Las serinas iniciadoras están marcadas en rojo. El dominio N-terminal que se ha intercambiado entre ϕ 29 y Nf está señalado en rosa, y la hélice intercambiada entre ϕ 29, Nf y GA-1, en azul. Las quimeras obtenidas se representan con los residuos cambiados en azul, rosa o verde, según pertenezcan a ϕ 29, Nf o GA-1, respectivamente. Los números de acceso para las TP son los siguientes: ϕ 29 (número de acceso del UniProtKB P03681), Nf (número de acceso del GenBank ACH57070.1) y GA-1 (referencia de la secuencia del NCBI NP073686.1).

Como se ha comentado anteriormente, los fagos Nf y GA-1 están relacionados con ϕ 29, mostrando sus TPs una identidad de secuencia del 62.4% y 40% con la de ϕ 29, respectivamente. Basándonos en estos datos, construimos TPs quiméricas de ϕ 29 mediante la sustitución de dicha hélice α por las correspondientes de las TPs de los fagos Nf y GA-1. De la misma manera, hicimos TPs quiméricas de Nf y GA-1 en las que se sustituyó esta hélice por la de ϕ 29. Si la hipótesis de partida fuera correcta, sería esperable que dichas TPs quiméricas tuvieran la capacidad de reconocer específicamente el origen de replicación del fago que proporciona dicha hélice α .

Los residuos intercambiados de la TP son aquellos que en base a la estructura del heterodímero no parece que establezcan contactos con la DNA polimerasa (Figura 45). Los residuos cambiados fueron del 87 al 109 en ϕ 29 y Nf y del 87 al 108 en GA-1, obteniendo cuatro quimeras, tal y como se observa en la Figura 45: Phi29Nf (la TP de ϕ 29 excepto los residuos del 87 al 109 que son de Nf), NfPhi29 (Nf excepto los residuos del 87 al 109 de ϕ 29),

Phi29GA-1 (ϕ 29 excepto los residuos del 87 al 108 de GA-1) y GA-1Phi29 (GA-1 excepto los residuos del 87 al 109 de ϕ 29). Estas TPs quiméricas fueron sobreexpresadas y purificadas como está descrito en Materiales y Métodos (Zaballos *et al.*, 1989) y analizadas mediante ensayos *in vitro*.

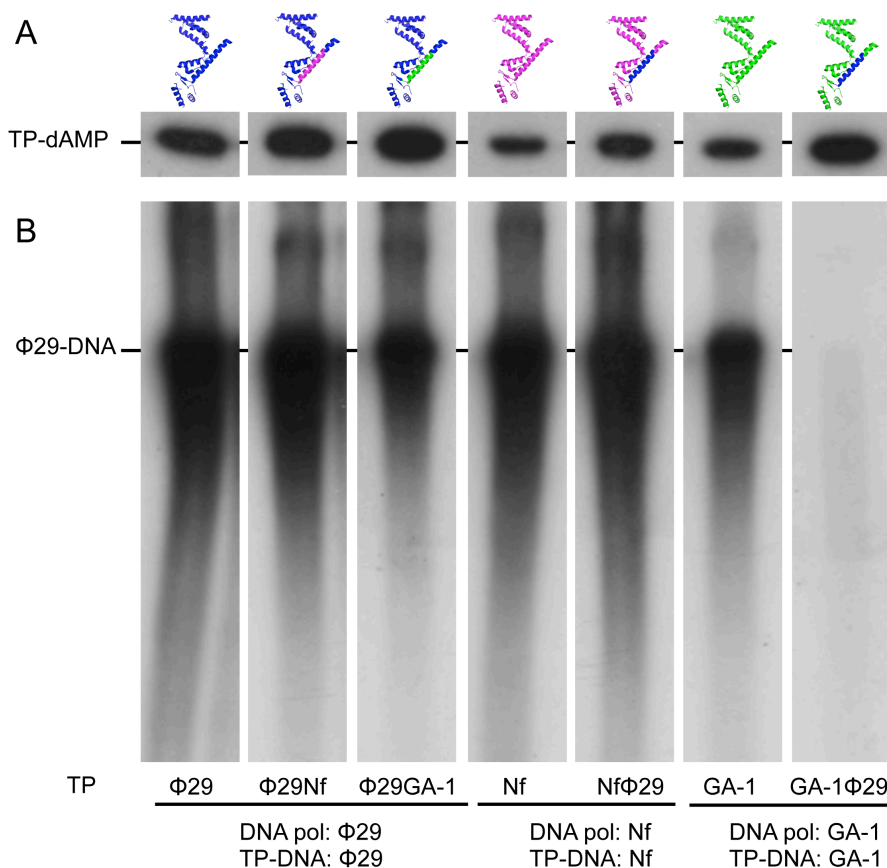


Figura 46: Replicación del TP-DNA. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Iniciación con TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 160 nM de TP *wild-type* o quimera, 16 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM del TP-DNA de ϕ 29, Nf o GA-1 y 1 mM $MnCl_2$. Tras 10 minutos de incubación a 30 °C las muestras fueron paradas, procesadas y analizadas en gel para su posterior autorradiografía. La posición del complejo TP-dAMP está indicada. **(B)** Replicación del TP-DNA. El ensayo se realizó en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o quimera, 13 nM de DNA polimerasa, 1.6 nM del TP-DNA de ϕ 29, Nf o GA-1 y 10 mM $MgCl_2$. En el caso de Nf la mezcla de reacción también contenía 35 μ M DBP de Nf. La incubación se realizó durante 10 minutos a 30 °C y la longitud del DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina.

Para estudiar la función iniciadora de las TPs quiméricas evaluamos la formación del complejo TP-dAMP usando como molde TP-DNA. Como se observa en la Figura 46A todas las quimeras presentaron un nivel de iniciación incluso mayor que el obtenido con las TPs *wild-type*.

Estudios previos mostraron que las DNA polimerasas de los bacteriófagos Nf y GA-1, al igual que ocurre en ϕ 29, no necesitan factores de procesividad ni proteínas tipo helicasa para una síntesis eficiente de su genoma (TP-DNA). Además, ambas polimerasas presentan una alta

procesividad y la capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda (Longás *et al.*, 2006). Se ha descrito que la DNA polimerasa de Nf requiere la presencia de su DBP (proteína de unión a banda doble) homóloga para conseguir una replicación eficiente de su TP-DNA *in vitro*. Para evaluar si el cambio de la hélice en estudio estaría afectando al proceso de replicación realizamos ensayos usando un sistema mínimo de replicación basado en el TP-DNA, la DNA polimerasa y la TP de cada fago, y en el caso de Nf, la DBP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El intercambio de esta hélice entre las TPs de $\phi 29$ y Nf, no afectó a la replicación, obteniéndose unos niveles incluso mayores que cuando se utilizaron las TPs *wild-type*. Sin embargo, cuando el intercambio se produjo entre las TPs de $\phi 29$ y GA-1, los niveles de replicación estaban moderadamente (Phi29GA-1) o muy afectados (GA-1Phi29), como se observa en la Figura 46B. Esta disminución de los valores de replicación, en contraste con el alto grado de iniciación que presentó la DNA polimerasa usando como iniciadoras las quimeras Phi29GA-1 y GA-1Phi29 probablemente se debe a defectos en la transición entre la iniciación con TP y la elongación con DNA.

A pesar de sus elevados niveles de iniciación y replicación, la quimera Phi29Nf presentó graves defectos en la amplificación del TP-DNA (5%). A los ochenta minutos de reacción, se adicionó heterodímero *wild-type* de $\phi 29$ o Nf, o el heterodímero formado por la DNA polimerasa de $\phi 29$ y la quimera Phi29Nf, sin que se produjese una nueva incorporación de dAMP cuando se adicionó el heterodímero de Nf o el formado por la DNA polimerasa de $\phi 29$ y la quimera Phi29Nf. Sí se produjo un pequeño aumento cuando se adicionó heterodímero *wild-type* de $\phi 29$ (Figura 47). Estos resultados podrían indicar un papel de esta hélice cuando la quimera se encuentra como TP paterna en el reconocimiento del origen de replicación por el heterodímero.

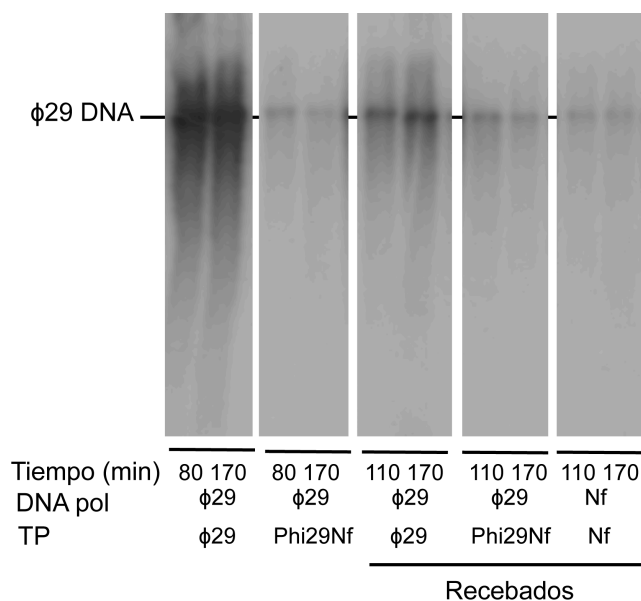


Figura 47: Ensayo de recuperación de la amplificación con la quimera Phi29Nf. El ensayo de amplificación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Tras 80 minutos de incubación, se añadieron a la reacción heterodímeros TP/DNA polimerasa con la TP *wild-type* o con la quimera Phi29Nf. Las muestras se pararon al tiempo indicado.

Para dilucidar el papel de esta hélice en el reconocimiento del origen de replicación, evaluamos la formación de TP-dAMP usando sistemas heterólogos de DNA polimerasa, TP y TP-DNA de los tres fagos. Como vemos en la Figura 48, la TP de $\phi 29$ funciona como iniciadora con su sistema homólogo de DNA polimerasa y TP-DNA. Además, también se detecta levemente la formación de TP-dAMP con el heterodímero DNA polimerasa/TP de $\phi 29$ y el TP-DNA de Nf. En el caso de la quimera Phi29Nf, además de iniciación con la DNA polimerasa y el TP-DNA de $\phi 29$, se observó un poco de iniciación con el TP-DNA de Nf cuando se usaron las DNA polimeasas de $\phi 29$ o Nf, algo más cuando la DNA polimerasa usada es la de Nf. En contraste, Phi29GA-1 solamente inicia con la DNA polimerasa y el TP-DNA de $\phi 29$. En cuanto a Nf, observamos formación de TP-dAMP con su DNA polimerasa y TP-DNA homólogos, aunque se observa una ligera iniciación con el TP-DNA de $\phi 29$ usando la DNA polimerasa de $\phi 29$. NfPhi29 inicia con el sistema de Nf, y ligeramente con la DNA polimerasa y el TP-DNA de $\phi 29$. En GA-1, además de con su sistema homólogo, se observó algo de formación del producto de iniciación en presencia de la DNA polimerasa y el TP-DNA de $\phi 29$. Sin embargo, con GA-1Phi29 solo hubo iniciación con la DNA polimerasa y el TP-DNA de GA-1. Estos resultados junto con los mostrados en la Figura 46, nos indican que la hélice en estudio no está implicada en el reconocimiento del origen de replicación.

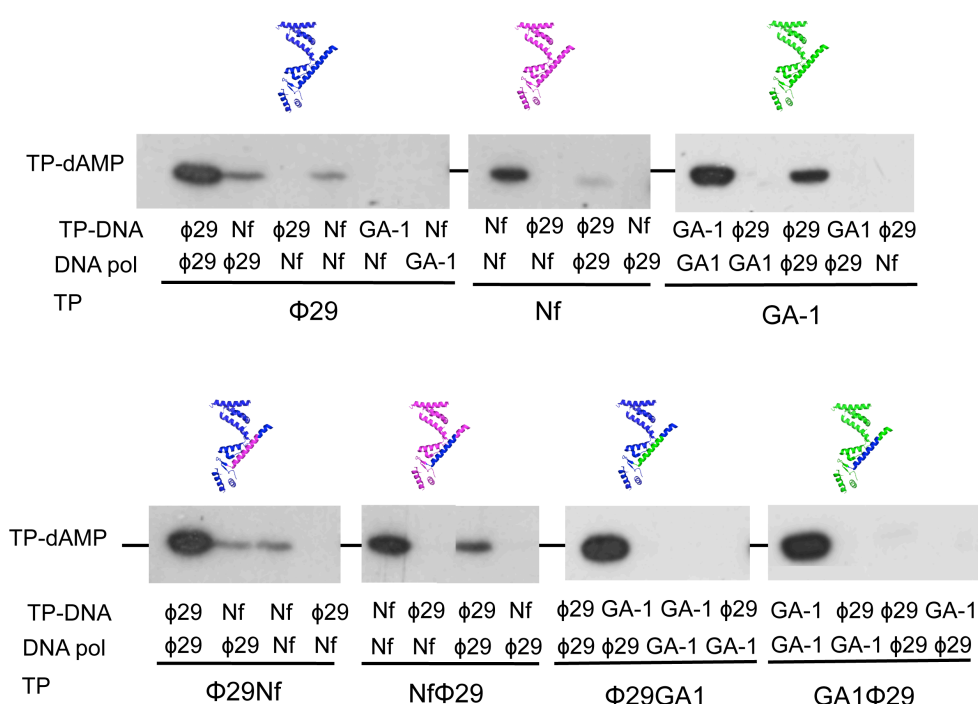


Figura 48: Formación de TP-dAMP con los sistemas heterólogos de $\phi 29$, Nf y GA-1. El ensayo se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 160 nM de TP *wild-type* o quimera, 16 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM del TP-DNA de $\phi 29$, Nf o GA-1 y 1 mM $MnCl_2$. La TP, DNA polimerasa y TP-DNA utilizado en cada caso aparece indicado. La incubación se realizó durante 10 minutos a 30 °C. La posición del complejo TP-dAMP está indicada.

4.2. Papel del dominio N-terminal de la TP en el reconocimiento del origen de replicación

Estudios previos realizados con un mutante de la TP de $\phi 29$ que carecía del dominio N-terminal sugerían la importancia de una estructura correcta en la TP iniciadora para la apertura de los orígenes de replicación *in vitro* por el heterodímero DNA polimerasa/TP. Además, se observó que este mutante no era capaz de iniciar la replicación usando como molde TP-DNA en ausencia de la proteína DBP, por lo que no podría descartarse un contacto directo entre el dominio N-terminal de la TP iniciadora y el dominio intermedio de la TP parental (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estos datos y los resultados obtenidos con las quimeras de la primera hélice α del dominio intermedio de la TP, construimos quimeras de la TP de los fagos $\phi 29$ y Nf intercambiando el dominio N-terminal (residuos 1-73) para estudiar su implicación en el reconocimiento del origen de replicación. Se construyeron dos quimeras: NNfC ϕ , que tenía el dominio N-terminal de Nf y los dominios intermedio e iniciador de $\phi 29$, y N ϕ CNf, con el dominio N-terminal de $\phi 29$ y el resto de TP de Nf (Figura 45). Las quimeras se sobreexpresaron y purificaron tal y como está descrito en Materiales y Métodos (Mencía *et al.*, 2011) y se analizaron mediante ensayos *in vitro*.

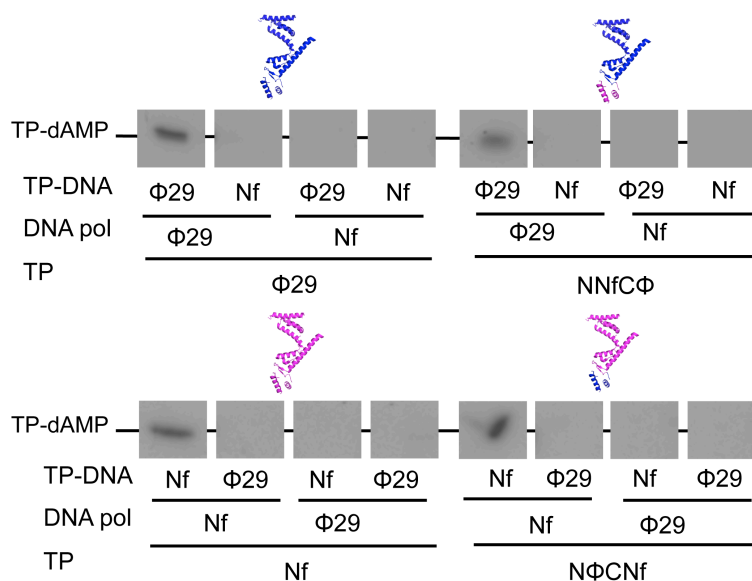


Figura 49: Formación de TP-dAMP con los sistemas heterólogos de $\phi 29$ y Nf. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o quimera, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM del TP-DNA de $\phi 29$ o Nf y 1 mM $MnCl_2$ (2 mM $MnCl_2$ con la DNA polimerasa de Nf). La TP, DNA polimerasa y TP-DNA utilizados en cada caso aparece indicado. La incubación se realizó durante 10 minutos a 30 °C. La posición del complejo TP-dAMP aparece indicada a la izquierda.

Para estudiar la implicación de este dominio en el reconocimiento del origen de replicación, realizamos el ensayo de iniciación usando los sistemas heterólogos con las DNA polimerasas y los TP-DNAs de $\phi 29$ y Nf. En las condiciones ensayadas, como se observa en la Figura 49, solo se obtuvo formación de TP-dAMP, tanto en el caso de las TPs *wild-type* como en el de las quiméricas cuando usamos los sistemas homólogos de DNA polimerasa, TP y TP-

DNA del mismo fago. Estas condiciones son más restrictivas a las utilizadas en la Figura 48, donde se usaron unas concentraciones de proteína y unos tiempos más elevados, para detectar la formación del TP-dAMP. Por esta razón, los pequeños niveles de iniciación que se obtenían con el heterodímero DNA pol/TP de $\phi 29$ con el TP-DNA de Nf, en este caso no se obtienen. Podemos concluir que el dominio N-terminal de la TP tampoco está implicado en el reconocimiento del origen de replicación, ni afecta a la capacidad de iniciación de la DNA polimerasa, de acuerdo con los estudios cristalográficos que descartaban una interacción entre la DNA polimerasa y el dominio N-terminal de la TP.

Cuando se evaluó la capacidad de las DNA polimerasas para replicar el TP-DNA usando como iniciadoras las quimeras, se observó que el nivel de replicación era muy similar al obtenido con las TPs *wild-type* o incluso mejor (Figura 50). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que el dominio N-terminal no tiene un papel en el paso de transición de la replicación del TP-DNA.

En el caso de la quimera NNfC ϕ también se ensayó en amplificación (la quimera N ϕ CNf no pudo evaluarse ya que la amplificación no está puesta a punto para el sistema de Nf), obteniéndose unos valores similares a la *wild-type* (78%), descartando un papel de este dominio en el reconocimiento del origen de replicación cuando la quimera se encuentra como TP paterna.

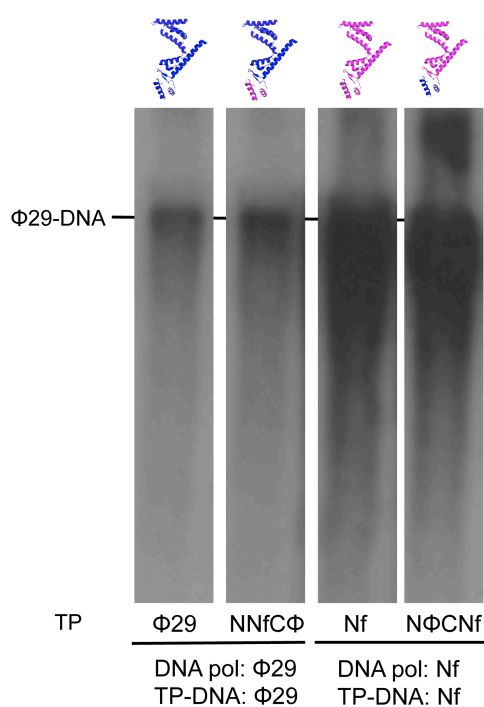


Figura 50: Replicación del TP-DNA. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 13 nM de TP *wild-type* o quimera, 13 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM del TP-DNA de $\phi 29$ o Nf y 10 mM $MgCl_2$. En el caso de Nf la mezcla de reacción también contenía 35 μM DBP de Nf. La incubación se realizó durante 10 minutos a 30 °C, la longitud del DNA sintetizado se analizó en geles de agarosa alcalina.

El mismo ensayo mostrado en la Figura 48 se realizó utilizando como molde oligonucleótidos de banda simple con la secuencia del origen derecho de replicación de los fagos $\phi 29$ y Nf, en vez del TP-DNA. Esto nos permite estudiar el papel de este dominio en el reconocimiento del origen de replicación en ausencia de la TP parental. Como se observa en la

Figura 51, el dominio N-terminal tampoco parece estar jugando un papel en el reconocimiento del origen ya que el grado de iniciación obtenido con las quimeras fue similar al obtenido con las TPs *wild-type*.

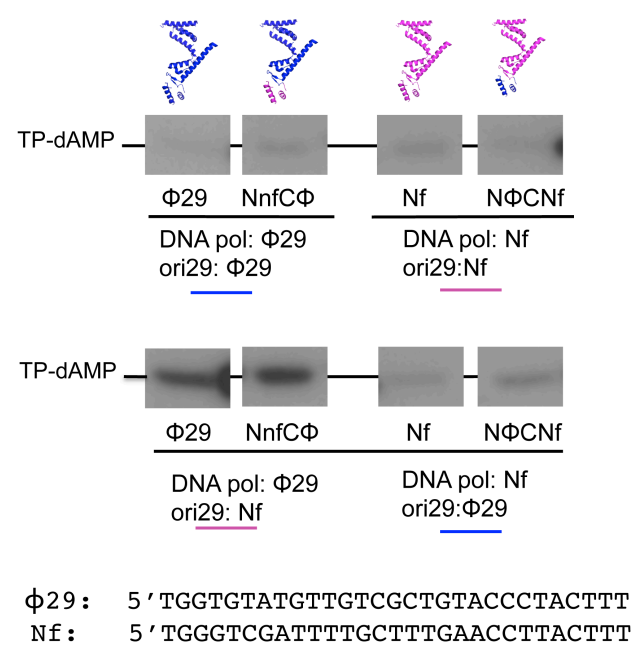


Figura 51: Formación de TP-dAMP con ssDNA de $\phi 29$ y Nf. El ensayo se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 130 nM de TP *wild-type* o quimera, 60 nM de la DNA polimerasa indicada, 1 mM $MnCl_2$ (2 mM $MnCl_2$ con la DNA polimerasa de Nf) y 2 μ M del ssDNA con la secuencia del origen de replicación derecho de $\phi 29$ o Nf, tal y como se indica. La incubación se realizó durante 1 hora a 12 °C. La posición del complejo TP-dAMP aparece indicada. En la parte de abajo se muestra la secuencia de los oligonucleótidos 29 mer utilizados, que corresponde al extremo derecho del origen de replicación de los fagos $\phi 29$ y Nf.

DISCUSIÓN

1. Implicación de los residuos de los dominios intermedio e iniciador de la TP de ϕ 29 en la interacción con la DNA polimerasa

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP de ϕ 29 (Kamtekar *et al.*, 2006) ha permitido la identificación de residuos de la TP que pueden ser responsables de la interacción con la DNA polimerasa. Así, en el dominio intermedio de la TP se han descrito residuos electropositivos (Arg158, Arg169) que forman puentes salinos con residuos electronegativos del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa (Glu291, Glu322). En contraste con el dominio intermedio, el dominio iniciador de la TP es electronegativo, y varios residuos ácidos (Glu191, Asp198) interaccionan con aminoácidos cargados positivamente de la polimerasa (Lys575, Lys557). Adicionalmente, el residuo R69 de la polimerasa interacciona con los residuos Gln253 y Tyr250 de la TP a través de puentes de hidrógeno e interacciones de apilamiento, respectivamente. Además, residuos de la hélice C-terminal del dominio iniciador de la TP (Glu252, Gln253, Arg256) forman puentes de hidrógeno con el subdominio TPR2 de la polimerasa (Leu416, Gly417, Glu419).

Para analizar el papel de los residuos anteriormente mencionados llevamos a cabo el estudio bioquímico de mutantes a alanina en los residuos Arg158, Arg169, Glu191, Asp198, Tyr250, Gly252, Gln253 y Arg256 de la TP de ϕ 29.

1.1. Los residuos Arg158 y Arg169 de la TP contribuyen a la estabilidad del complejo DNA polimerasa/TP

Análisis bioquímicos previos de los heterodímeros DNA polimerasa/TP de los fagos ϕ 29 y GA-1 mostraron que la interacción entre el dominio intermedio de la TP y el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa confiere la especificidad entre ambas proteínas, la cual es dependiente de su complementariedad estructural (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). La estructura del heterodímero de ϕ 29 mostró como los residuos Arg158 y Arg169 del dominio intermedio de la TP forman puentes salinos con los residuos Glu291 y Glu322, respectivamente, del subdominio TPR1 de la polimerasa. El hecho de que estos cuatro residuos estén altamente conservados en otras TP y DNA polimerasas que inician con TP, junto con nuestros resultados, apoyan la hipótesis de que no sólo la especificidad sino también la estabilidad del heterodímero reside en dichas interacciones, principalmente en la establecida entre la Arg158 de la TP y el Glu291 de la polimerasa, ya que el mutante R158A no interacciona con la DNA polimerasa en las condiciones ensayadas, ni es capaz de competir con la TP *wild-type* por la unión con la DNA polimerasa. Debido a este defecto en la interacción, el mutante es muy deficiente en el papel de iniciador. La especificidad y también la estabilidad del heterodímero se basa en las interacciones entre la DNA polimerasa y la TP y a esto contribuye principalmente el residuo Arg158 del dominio intermedio de la TP en su interacción con el residuo Glu291 de la DNA

polimerasa. Por tanto, la sustitución de este residuo tiene efectos en la estabilidad del complejo TP/DNA polimerasa.

Resultados previos mostraron que la interacción entre el dominio intermedio de la TP y el TPR1 de la polimerasa es necesario para un correcto posicionamiento del dominio iniciador de la TP en el centro de polimerización (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos con el mutante R169A nos llevan a proponer que el residuo Arg169 está implicado en la correcta interacción con la DNA polimerasa ya que, aunque el heterodímero formado por el mutante R169A con la polimerasa es estable en ensayos de gradiente de glicerol a 0.2 M NaCl (pero no a 0.4 M NaCl), muestra unas actividades de iniciación y amplificación reducidas y no es capaz de competir la interacción entre la TP *wild-type* y la DNA polimerasa.

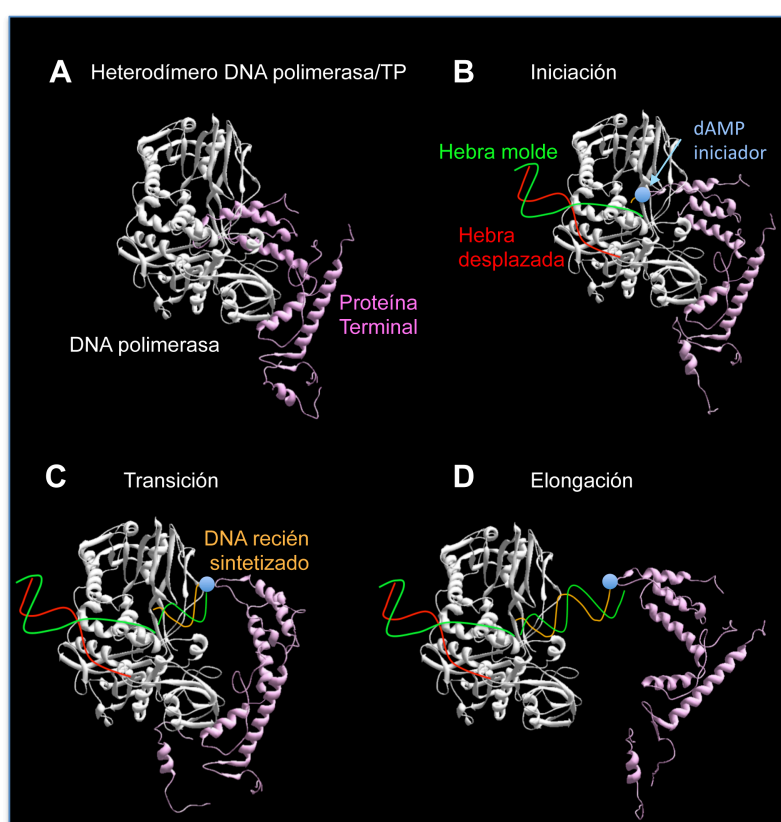


Figura 52: Representación esquemática de los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de $\phi 29$. La DNA polimerasa de $\phi 29$ aparece representada en blanco, la TP en rosa, la cadena molde en verde, la cadena desplazada en rojo, la cadena que se está sintetizando en naranja y el dAMP iniciador como un círculo azul. Los datos cristalográficos corresponden al heterodímero DNA polimerasa/TP de $\phi 29$ del Protein Data Bank (PDB) ID 2EX3.

Por otro lado, el mutante R169A no pudo actuar simultáneamente de TP iniciadora y parental, ya que la mutación introducida es crítica cuando se encuentra simultáneamente presente en ambas. Este resultado apoya la existencia de una interacción funcional entre las TPs paternas e iniciadora durante la replicación del TP-DNA como se ha descrito para otros residuos del dominio intermedio de la TP (Illana *et al.*, 1999; Serna-Rico *et al.*, 2000).

1.2. Implicación de los residuos Glu191 y Asp198 en la formación de un heterodímero funcional

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP mostró interacciones directas entre el dominio iniciador de la TP, electronegativamente cargado, y los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa. Así, se ha propuesto que los residuos Glu191 y Asp198 están interaccionando con los residuos Lys575 y Lys557 del *thumb* de la polimerasa (Kamtekar *et al.*, 2006).

Ambos contactos parecen ser también importantes para producir un heterodímero funcional. Así, el mutante E191A presentó una interacción defectuosa aunque estable con la DNA polimerasa, y su defecto en la actividad de TP-desoxiadenucleación es probablemente compensada en la replicación y la amplificación por sus altos niveles de iniciación y su elevada eficiencia en la transición. En cuanto al mutante D198A, podemos concluir que la correcta interacción entre el residuo Asp198 y el *thumb* de la DNA polimerasa parece ser crítica para garantizar una transición eficaz. Sin embargo, su actividad *wild-type* en amplificación sugiere que los defectos indicados deben ser compensados por su elevada actividad de iniciación.

1.3. Los residuos Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256 son importantes para la interacción funcional con la DNA polimerasa en el heterodímero

La estructura del heterodímero TP/DNA polimerasa mostró la existencia de contactos directos entre el dominio iniciador de la TP y el subdominio TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa. Los residuos Glu252, Gln253 y Arg256 de la hélice C-terminal del dominio iniciador de la TP se empaquetarían contra los residuos Leu416, Gln417 y Glu419 del subdominio TPR2 de la polimerasa. Además, la Gln253 de la TP contacta con la Arg96 localizada en el ápice de un *loop* del dominio exonucleasa de la DNA polimerasa y que se proyecta hacia la región de unión del DNA del dominio de polimerización. La Arg96 también interaccionaría con el residuo Tyr250 del dominio iniciador de la TP. Los resultados de esta Tesis muestran que los mutantes Y250A, E252A, Q253A y R256A son muy ineficientes en su papel como iniciadores en la reacción de TP-desoxinucleotidilación. Esta reacción depende exclusivamente de la interacción entre la DNA polimerasa y la TP, por lo que los defectos exhibidos por los mutantes en este ensayo estarían indicando la formación de un heterodímero afectado. Aunque en los ensayos de interferencia no son capaces de competir con la TP *wild-type* por la unión con la DNA polimerasa, sí forman un heterodímero estable con ésta en gradientes de glicerol a 0.2 M NaCl. Sin embargo, a 0.4 M NaCl, mientras que la TP *wild-type* continúa unida a la DNA polimerasa, estos mutantes no están formando el heterodímero. Estos resultados nos permiten proponer un papel para estos residuos (Tyr250, Glu252, Gln253 y Arg256) en la interacción funcional con la DNA polimerasa en el heterodímero permitiendo el

posicionamiento correcto del *priming-loop* de la TP en el sitio activo de polimerización de la DNA polimerasa.

A pesar de presentar defectos en su papel como iniciadores (sobre todo los mutantes Q253A y R256A), cuando se evaluaron en la replicación presentaron una clara recuperación con valores *wild-type* (Y250A y E252A) o moderadamente disminuidos (Q253A y R256A). Como se ha descrito anteriormente, existe una fase de transición entre la iniciación con TP y la elongación con la DNA polimerasa (Figura 52). Para una correcta transición es necesario la disociación del heterodímero DNA polimerasa/TP. El hecho de que la interacción entre estos mutantes y la DNA polimerasa está afectada podría favorecer la disociación del heterodímero durante la transición. La cantidad de productos intermedios detectados con estos mutantes durante la replicación truncada es mayor que la obtenida con la TP *wild-type*, por lo que su elevada eficiencia en la transición explica sus buenos niveles de replicación en comparación con la iniciación. Este fenotipo ya se había descrito previamente en mutantes de la región RGD de la TP (Illana *et al.*, 1998) implicada en la interacción con la DNA polimerasa, así como en mutantes de la DNA polimerasa defectivos en su interacción con la TP (de Vega *et al.*, 1998a). Estudios realizados con mutantes de la región RGD (Arg256, Gly257, Asp258 que incluye uno de nuestros residuos en estudio, la Arg256) mostraron que si bien estaban afectados en su papel como iniciadores presentaban unos altos niveles de replicación, siendo un ejemplo de como una interacción defectuosa con la DNA polimerasa, que reduce el número de eventos de iniciación esperados podría mejorar la eficacia de la transición compensando así el número final de moléculas elongadas (Illana *et al.*, 1998).

Curiosamente, y a pesar de sus niveles en replicación, los mutantes Q253A y R256A están muy afectados en la amplificación del TP-DNA sugiriendo que una amplificación productiva del TP-DNA de $\phi 29$ *in vitro* depende de un ajustado equilibrio entre los diferentes pasos de la replicación, iniciación, transición y elongación. Así, si este balance se ve afectado, como ocurre con estos mutantes de la TP o con mutantes de la DNA polimerasa (de Vega *et al.*, 1998a) la eficiencia de la amplificación disminuirá. Como se ha descrito anteriormente, el residuo Arg96 del dominio exonucleasa de la DNA polimerasa interacciona con los residuos Gln253 y Tyr250 de la TP a través de puentes de hidrógeno e interacciones de apilamento, respectivamente (Kamtekar *et al.*, 2006). Asimismo, mutantes del residuo Arg96 de la polimerasa a alanina apoyan nuestros resultados, mostrando la importancia de este residuo en la interacción con la TP, y su papel esencial para la formación de un heterodímero estable DNA polimerasa/TP (Rodríguez *et al.*, 2004).

Como se ha descrito anteriormente, el heterodímero formado por la DNA polimerasa y la TP reconoce los orígenes de replicación en los extremos del genoma, siendo la TP parental la principal señal para el reconocimiento, ya que el uso de fragmentos de DNA que carecen de la TP parental hacen que la eficiencia de la reacción de iniciación caiga de 6 a 10 veces con

respecto a la actividad obtenida con el TP-DNA (González-Huici *et al.*, 2000b; Gutiérrez *et al.*, 1986a). Como demuestran nuestros resultados, excepto en el caso del mutante D198A, los defectos mostrados por el resto de mutantes de la TP en su interacción con la DNA polimerasa son aún más evidentes cuando la formación del TP-dAMP fue ensayada en ausencia del TP-DNA. Estos datos sugieren que la formación de un heterodímero catalíticamente competente se basa en los contactos con la TP parental, que son críticos para un fino ajuste e interacción entre la DNA polimerasa y la TP iniciadora y esto puede aliviar algunos de los defectos causados en el heterodímero por las mutaciones introducidas en la TP. A la vista de los resultados podemos concluir que los residuos Glu191 y Asp198 son importantes para la formación de un heterodímero funcional.

Por lo tanto, todos los resultados anteriores muestran que la sustitución de estos residuos tiene efecto en la estabilidad del complejo TP/DNA polimerasa (R158A) o en la interacción funcional de la TP en el sitio activo de polimerización (R169A, E191A, Y250A, E252A, Q253A y R25A) afectando a los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de $\phi 29$, permitiéndonos proponer el papel de estos residuos en el mantenimiento del equilibrio entre la estabilización del dominio iniciador de la TP y su salida gradual del sitio activo de polimerización de la DNA polimerasa cuando el nuevo DNA está siendo sintetizado.

2. Importancia de la Lys529 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en la estabilización de la cadena iniciadora del DNA

La resolución de la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ formando complejo con una estructura molde/iniciador, mostró que el residuo Lys529 localizado en el C-terminal del subdominio *palm*, establece un puente de hidrógeno con uno de los grupos fosfato del enlace fosfodiéster entre el último y penúltimo nucleótido en 3' de la cadena iniciadora (Berman *et al.*, 2007). Además, el alineamiento de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con las polimerasas de fagos relacionados mostró que esta lisina es un residuo conservado. Para estudiar el papel de este residuo en la estabilización de la cadena iniciadora, así como en la coordinación de las actividades de polimerización y exonucleolisis, sustituimos este residuo por alanina o glutámico.

2.1. El residuo Lys529 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ es importante para garantizar la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización y como consecuencia, en la inserción del nucleótido entrante

Los análisis bioquímicos realizados con las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ K529A y K529E mostraron que dichas enzimas presentan una mayor actividad exonucleasa sobre sustratos de DNA de banda doble que sobre DNA de banda simple. Como consecuencia, la

concentración de dNTPs requerida para obtener una elongación eficiente es más elevada. Para estudiar el efecto de las mutaciones introducidas en la polimerización se realizaron ensayos utilizando estas mismas polimerasas mutantes pero deficientes en la actividad exonucleasa, comprobándose que la pobre elongación de la cadena iniciadora no se debe solo a su elevada actividad exonucleasa, sino también a defectos en la incorporación de los nucleótidos. Además, presentan una disminución en la estabilización de la cadena iniciadora en los ensayos de retraso en gel.

Los resultados obtenidos con los mutantes de la Lys529 apoyan el papel de esta lisina en el correcto posicionamiento y orientación de la cadena iniciadora en el sitio activo de polimerización requerido para lograr una eficiente inserción del nucleótido entrante en la cadena que está siendo sintetizada.

2.2. La Lys529 es crítica en el paso de translocación requerido para la incorporación del siguiente nucleótido entrante

Una vez que se produce la reacción de transferencia del grupo fosforilo, el nucleótido incorporado tiene que moverse desde el sitio de inserción hasta el de iniciación para permitir la incorporación del siguiente nucleótido entrante. Este paso de translocación hace posible el movimiento de la polimerasa sobre el molde de DNA, un paso crítico en el ciclo de adición de nucleótidos de las polimerasas replicativas (Figura 53). Los análisis estructurales de los estados pre- y post-translocación de la DNA polimerasa de $\phi 29$ revelaron que el mecanismo de translocación depende del movimiento coordinado de dos residuos de tirosina conservados, simultáneamente a la apertura de los *fingers* que tiene lugar inmediatamente después de la inserción del nucleótido entrante. Por tanto, estas tirosinas se posicionan en el sitio de inserción ocupado por el nucleótido recién insertado, favoreciendo el movimiento hacia atrás de la cadena iniciadora al sitio de iniciación post-translocación (Berman *et al.*, 2007).

Como se ha mostrado en esta Tesis, el mutante K529E y en menor medida el K529A, muestran un bloqueo en su actividad de polimerización tras la adición del primer nucleótido, lo que sugiere un defecto en la translocación del extremo 3' de la cadena iniciadora al sitio de iniciación. Se podría predecir que una vez que el nucleótido se ha adicionado, la interacción inicial entre la Lys529 y el extremo 3' del DNA se rompe durante la translocación para permitir que la cadena lateral de la Lys529 interaccione con el nuevo enlace fosfodiéster en el estado postranslocación. Por lo tanto, nuestros resultados resaltan la importancia que en este estadio crítico de polimerización tiene la adecuada estabilización del extremo del iniciador en el centro activo de polimerización.

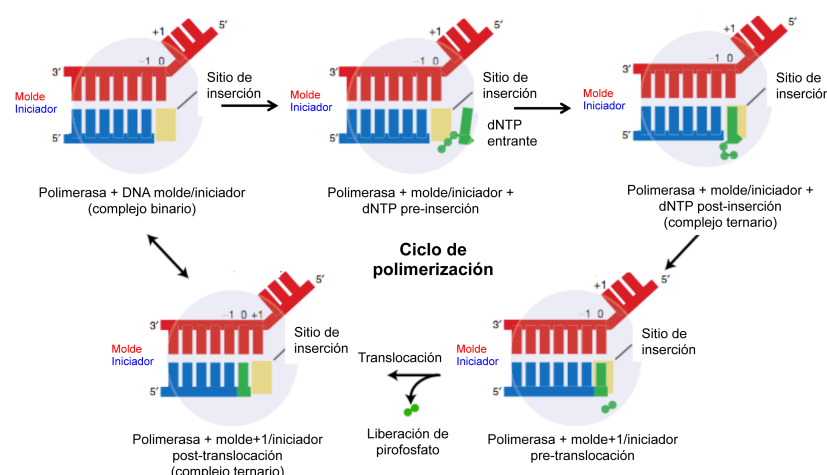


Figura 53: Ciclo de polimerización. La polimerasa aparece representada como un círculo azul claro. El sustrato con estructura molde/iniciador está representado en azul (iniciador) y rojo (molde). El dNTP entrante aparece en verde. El nucleótido entrante se une al sitio de pre-inserción (en amarillo), frente al nucleótido molde. Después, la polimerasa cataliza la incorporación del dNTP en la cadena iniciadora. Los números de la cadena molde indican la posición de la base en el complejo binario inicial. (Modificado de Berman *et al.*, 2007).

2.3. La Lys529 podría regular la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa actuando como barrera para prevenir el exceso de degradación del sustrato

La mayoría de las DNA polimerasas dependientes de DNA presentan al menos dos actividades catalíticas, polimerización y exonucleólisis 3'-5', dirigidas por centros activos localizados en dos dominios distantes y estructuralmente independientes (Hopfner *et al.*, 1999; Kamtekar *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999). Como consecuencia, se necesita un perfecto acoplamiento de dichas actividades y un movimiento efectivo del extremo 3' de la cadena iniciadora de un centro activo al otro para llevar a cabo la replicación del DNA de manera eficiente y fiel. La decisión de elongar frente a reducir la longitud de la molécula iniciadora depende de la tasa relativa de cada reacción catalítica (polimerización o exonucleólisis). Asumiendo una temperatura y fuerza iónica constantes y una ausencia de variaciones significativas en la concentración de dNTPs, el principal factor que controla este equilibrio es la estabilidad del sustrato en cada centro activo (de Vega *et al.*, 1996; Truniger *et al.*, 1996). La estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización depende de interacciones específicas entre la DNA polimerasa y el DNA y de interacciones de Watson y Crick con la cadena molde. En condiciones normales la estabilidad de la unión de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización debe ser mayor que en el centro activo de exonucleólisis, permitiendo el proceso de polimerización. Los factores más importantes que reducen la estabilidad del extremo iniciador en dicho centro activo son alta temperatura, baja fuerza iónica y sobre todo, la presencia de un extremo desapareado que

provoca la disminución de la velocidad de polimerización, favoreciendo la unión del extremo 3' en el centro activo de exonucleólisis. Si durante el proceso de replicación la DNA polimerasa incorpora un nucleótido erróneo, éste ha de ser eliminado en el centro activo exonucleasa 3'-5'. Así, el extremo 3' desapareado provoca una disminución en la tasa de polimerización y el par de bases erróneo formado hace que se rompan interacciones entre la DNA polimerasa y el surco menor del DNA. Como consecuencia, este DNA menos estabilizado en el centro activo de polimerización se dirige al centro activo exonucleasa 3'-5' para que el nucleótido incorrecto sea eliminado (Donlin *et al.*, 1991; Franklin *et al.*, 2001; Johnson, 1993).

El análisis de la actividad exonucleolítica bajo condiciones de un único evento de unión entre la DNA polimerasa y el DNA mostraron que, al contrario de lo que ocurre con la enzima *wild-type*, los mutantes no presentan paradas en posiciones intermedias durante el proceso de degradación. Por lo tanto, podemos concluir que la Lys529 podría estar actuando de barrera para prevenir el exceso de degradación de los sustratos, regulando la actividad exonucleolítica de la enzima. Estos resultados coinciden con el modelo propuesto para la DNA polimerasa de $\phi 29$, en el que el movimiento del extremo de la cadena iniciadora entre ambos centros activos se produce mediante difusión pasiva (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2006). Así, se rompen interacciones específicas entre el extremo desapareado y residuos de la DNA polimerasa del centro activo de polimerización y se crean nuevas interacciones con residuos especializados en unir ssDNA en el centro activo exonucleasa, mientras que otras interacciones se mantendrían constantes. Por lo tanto, la pobre estabilización de la cadena iniciadora exhibida por los mutantes podría aumentar su difusión al centro activo exonucleasa.

Además, la elevada actividad exonucleasa mostrada por los mutantes sobre ssDNA podrían estar indicando que este sustrato sigue el mismo “camino” que la cadena iniciadora hacía el centro activo exonucleasa, y la Lys529 podría estar interaccionando con este sustrato para limitar su degradación. En la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con un oligonucleótido (dT)₅ unido en su centro activo exonucleasa, el residuo Lys529 podría estar contactando con el nucleótido en 5' (Kamtekar *et al.*, 2004) (Figura 54), lo que explicaría la elevada actividad exonucleasa mostrada por los mutantes de la DNA polimerasa en sustratos de 5mer. Basados en esta estructura, el nucleótido en 5' de un sustrato de 4mer no establecería contactos con la Lys529, explicando la actividad exonucleasa *wild-type* exhibida por los mutantes con este oligonucleótido. Por tanto, solo cuando la longitud del sustrato es muy reducida (4mer o inferior) las mutaciones introducidas en la Lys529 no tienen efecto en la degradación, ya que en estas condiciones la estabilización del sustrato depende solo de los residuos localizados en el dominio exonucleasa.

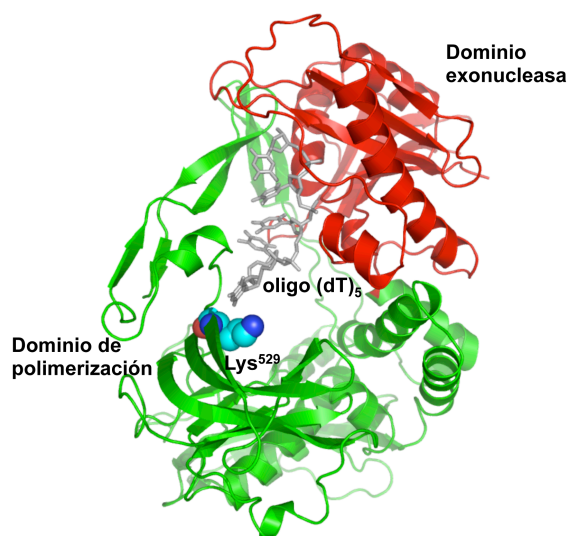


Figura 54: Vista posterior de la interacción del nucleótido en 5' del oligonucleótido (dT)₅ con la Lys529. Los datos cristalográficos corresponden a la DNA polimerasa de ϕ 29 con el oligonucleótido (dT)₅ unido al dominio exonucleasa. Protein Data Bank (PDB) ID 1XHZ (Kamtekar et al., 2004). Se muestra como el residuo Lys529 (representado como esferas) interactúa con el fosfato en 5' del ssDNA (representado en gris). Los dominios de polimerización y exonucleolisis están representados en verde y rojo, respectivamente.

3. El contacto directo entre la Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 y el Glu233 de la TP es necesario para la iniciación de la replicación del TP-DNA

El *priming-loop* de la TP (residuos 214-223) contiene el residuo Ser232 que proporciona el grupo hidroxilo iniciador para la síntesis del DNA. La ausencia de una estructura ordenada del *priming-loop* en la resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP impide el análisis de potenciales interacciones de esta región de la TP con la DNA polimerasa. Se podría especular que si el grupo OH de la Ser232 se encuentra en la posición de iniciación de la DNA polimerasa, de forma análoga al 3'-OH del DNA en el complejo binario, el residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 podría interactuar con el residuo Glu233 de la TP, mimetizando el último enlace fosfodiéster del extremo 3' del DNA (Figura 55). Esta hipótesis concuerda con la baja actividad mostrada por los mutantes K529A y K529E en la formación del complejo de iniciación (TP-dAMP), y con la recuperación de niveles de iniciación *wild-type* obtenidos con el heterodímero formado entre la DNA polimerasa mutante K529E y la TP mutante E233K, en donde se restablece la interacción entre ambos residuos, pero esta vez con la Lys en la TP (en lugar de la DNA polimerasa) y el Glu en la DNA polimerasa (en lugar de la TP).

Por lo tanto, el residuo Lys529 parece jugar un papel en garantizar la correcta estabilización y orientación del residuo iniciador Ser232 en el centro activo de polimerización, a través de su interacción con el residuo Glu233 de la TP. Sin embargo, no parece tener un papel en la estabilización general del heterodímero, como se deduce de los ensayos de ultracentrifugación en gradiente de glicerol en el que los mutantes K529A y K529E siguen formando un heterodímero estable con la TP en las condiciones ensayadas.

A pesar de los bajos niveles de iniciación obtenidos con el mutante de la TP E233K y la DNA polimerasa *wild-type*, la proporción entre los productos elongados [TP-(dNMP)₃₋₁₄] y los complejos de iniciación [TP-(dAMP)₁₋₂] es similar a la obtenida con el heterodímero *wild-type*, y los niveles de replicación son consistentes con su nivel de iniciación, por lo que podemos concluir que el papel del Glu233 de la TP se limita a la etapa de iniciación y no es un residuo fundamental en las etapas de transición o replicación.

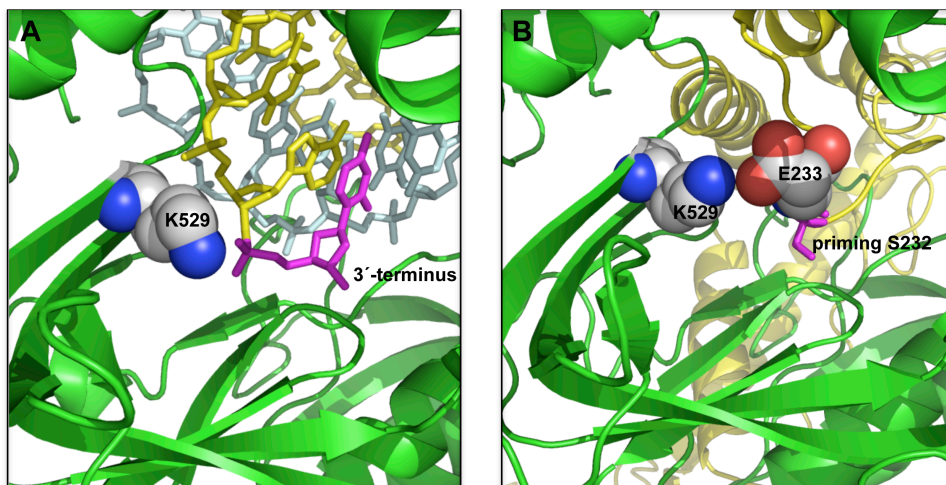


Figura 55: Interacciones de la Lys529. (A) La Lys529 forma un puente de hidrógeno con el último enlace fosfodiéster en 3' de la cadena iniciadora. La cadena iniciadora y la cadena molde están representadas en amarillo y azul, respectivamente. El último nucleótido en 3' de la cadena iniciadora posicionado en el sitio de iniciación de la DNA polimerasa está coloreado en magenta. (B) El modelado de la TP en el centro activo de polimerización predice una interacción similar entre la Lys529 y el Glu233 del *priming-loop* de la TP.

Sin embargo, mutaciones en la Lys529 dificultan el progreso de la DNA polimerasa más allá de los productos de iniciación TP-(dAMP)₁₋₂, independientemente de los niveles de iniciación obtenidos con la TP *wild-type* o el mutante E233K. Se ha descrito que una vez que la DNA polimerasa cataliza la formación del producto de iniciación TP-dAMP, en una reacción dirigida por la segunda timina en 3', se transloca una posición hacia atrás para recuperar la información correspondiente a la primera T de la cadena molde, mediante un mecanismo conocido como *sliding-back* (Méndez *et al.*, 1992). Este paso podría ser análogo a la translocación del extremo 3' de la cadena de DNA que está siendo sintetizada del sitio de inserción al sitio de iniciación (Figura 53). Así, tal y como ocurre con un sustrato de DNA, una vez que las polimerasas mutantes han realizado la reacción de iniciación no pueden elongar los productos de iniciación. Esta deficiencia en seguir adelante señala la importancia del residuo Lys529 en la translocación de la DNA polimerasa tanto cuando inicia con DNA como con TP.

Por lo tanto, podemos concluir el papel de la Lys529 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en garantizar la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, y como consecuencia, en la inserción del nucleótido entrante. Además, la interacción entre la

Lys529 y el extremo 3' del DNA es crítica en el paso de translocación requerido para la incorporación del siguiente nucleótido entrante.

Los ensayos realizados combinando los mutantes de la DNA polimerasa con mutantes del Glu233 de la TP nos permiten proponer la existencia de un contacto directo entre el Glu233 de la TP y la Lys529 de la DNA polimerasa necesario para la iniciación de la replicación del TP-DNA y posterior translocación para permitir que se complete la replicación del genoma. Todos estos resultados son compatibles con una unión secuencial del residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 con la TP y el DNA durante la replicación del TP-DNA.

4. La TP paterna no parece estar implicada en el reconocimiento del primer nucleótido que sirve de molde en la replicación de ϕ 29.

El primer paso en la replicación del DNA ϕ 29 requiere la formación de un heterodímero entre la DNA polimerasa y la TP iniciadora que reconoce el origen de replicación localizado a ambos extremos de su genoma lineal. Este heterodímero interacciona con los orígenes de replicación por reconocimiento específico de la TP parental y secuencias del DNA. Mediante el uso de oligonucleótidos de banda simple que contenían la secuencia del extremo derecho del fago y variantes en la misma (Méndez et al., 1992) y mediante la utilización de fragmentos de DNA que contenían las secuencias terminales de ϕ 29 (González-Huici et al., 2000b) se determinó que la reacción de iniciación ocurre frente al segundo nucleótido en 3' del molde. Ambos sustratos carecen de la TP unida covalentemente a los extremos 5' de la cadena no molde. Estudios previos mostraron que la presencia de esta TP parental es la principal señal para que el heterodímero DNA polimerasa/TP reconozca el origen de replicación, ya que cuando se realizaron ensayos usando como molde fragmentos de DNA que no tienen la TP parental, los niveles de iniciación cayeron de seis a diez veces con respecto a la actividad obtenida con TP-DNA (González-Huici *et al.*, 2000b; Gutiérrez *et al.*, 1986a). Debido a su importante papel en reclutar al heterodímero DNA polimerasa/TP al origen de replicación, analizamos si la TP parental estaría condicionando el correcto posicionamiento del heterodímero con respecto a los extremos 3' de la molécula utilizada como molde.

Puesto que ninguno de los sustratos analizados son el molde fisiológico de la DNA polimerasa de ϕ 29 y no permiten estudiar la influencia de la TP parental en la posición del molde que dirige la reacción de iniciación, diseñamos un sustrato que contuviese la TP parental y la secuencia del origen de replicación de ϕ 29, así como variantes de la misma, al que llamamos DNA reconstituido. Este DNA reconstituido nos permitió analizar si la TP parental tiene un papel en la selección de la posición del nucleótido que sirve de molde durante la reacción de iniciación. Cuando se utilizó como molde en la reacción de iniciación los resultados obtenidos fueron los mismos que cuando se utilizaron oligonucleótidos de banda simple que

contenían la secuencia del origen de replicación de $\phi 29$ y sus variantes. Estos resultados sugieren que a pesar de la importancia de la TP parental en el reconocimiento por el complejo DNA polimerasa/TP del origen de replicación, no parece estar implicada en el reconocimiento del primer nucleótido que sirve como molde en la reacción de iniciación. El DNA reconstituido también nos permitió estudiar la posible implicación de la TP parental en el *sliding-back*, indicando que no parece estar jugando ningún papel en este mecanismo.

5. Implicación del dominio iniciador de la TP de $\phi 29$ en el reconocimiento de la posición de iniciación en la replicación.

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\phi 29$ mostró que el dominio iniciador de la TP contiene los residuos del 174 al 266 y está formado por cuatro hélices α . Este dominio contiene la serina iniciadora que ocupa el mismo lugar en el centro activo de la DNA polimerasa que el DNA dúplex durante la elongación (Berman *et al.*, 2007; Kamtekar *et al.*, 2006).

Estudios previos realizados con quimeras de la TP, en las que se intercambiaron el dominio iniciador de las proteínas de $\phi 29$ y Nf, mostró que este dominio es el principal determinante estructural en dictar el nucleótido en 3' usado como molde en la reacción de iniciación (Longás *et al.*, 2008). En vista de estos resultados estudiamos qué región de este dominio es la responsable de esta selectividad.

5.1. Las hélices del dominio iniciador no son las responsables de dictar el nucleótido que dirige la reacción de iniciación.

Basados en la alta identidad de secuencia entre las TP de $\phi 29$ y Nf, y para estudiar qué parte del dominio iniciador es la responsable de esta selectividad, construimos quimeras con la TP de $\phi 29$ en las que intercambiamos las hélices del dominio iniciador por las de la TP de Nf. Los resultados mostraron que las hélices intercambiadas no eran responsables por sí mismas de dictar el nucleótido usado como molde en la iniciación, ya que ésta sigue ocurriendo frente al segundo nucleótido en 3', como en el caso de la TP *wild-type* de $\phi 29$.

Sin embargo, la hélice intercambiada en Phi29NfH1, parece estar jugando un papel importante en la transición. Los defectos que presenta en transición explican sus altos niveles de iniciación en comparación con su bajo nivel de replicación del TP-DNA. Así, mientras que el dominio intermedio se mantiene en una orientación fija realizando contactos estables con el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa, el dominio iniciador debe moverse en respuesta a la translocación del DNA tras la incorporación de los nucleótidos. Esto es posible debido a la flexibilidad de la región que actúa como bisagra y que conecta los dominios iniciador e intermedio (Kamtekar *et al.*, 2006). La hélice intercambiada (residuos 188-192), podría ser

importante en estabilizar los contactos correctos con la DNA polimerasa durante los cambios conformacionales que ocurren en la TP durante la transición. Los residuos intercambiados en la quimera Phi29NfH3 (residuos 213-225) podrían estar implicados en el correcto posicionamiento de la Ser232 en el centro activo de la DNA polimerasa, explicando los bajos niveles de iniciación y de replicación mostrados por esta quimera.

El uso de la quimeras dificulta el desplazamiento de banda de la DNA polimerasa. Estudios previos, tanto bioquímicos como estructurales, mostraron las bases moleculares del desplazamiento de banda. La inserción TPR2 contribuye, junto con los subdominios *fingers*, *palm* y *thumb* a la formación del dominio de polimerización. El ápice del TPR2 interacciona con el ápice del *thumb*, formando una estructura de arco que envuelve al nuevo DNA sintetizado durante la elongación y al dominio iniciador de la TP en los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de ϕ 29. Además, el TPR2 forma un túnel estrecho junto con el subdominio *fingers* y el dominio exonucleasa, por lo que el acceso de la hebra molde al centro activo de polimerización requiere que el extremo 3' se enhebre en este túnel. La inserción TPR2 juega un papel esencial en la coordinación de la polimerización del DNA y del desplazamiento de banda, garantizando la estabilización simultánea del nuevo DNA sintetizado y la apertura del DNA de banda doble actuando como una “cuña molecular”. Una pequeña distorsión de la orientación adecuada del TPR2 podría comprometer la coordinación entre la polimerización y el desplazamiento de banda, como se ha visto que ocurre mediante mutantes del centro activo exonucleasa 3'-5', en los que se altera la orientación del subdominio *thumb*, e indirectamente del TPR2. Teniendo en cuenta que la hélice 1 del dominio iniciador de ϕ 29 interacciona con el subdominio *thumb*, mientras que la hélice 3 contacta con el TPR2, es tentador especular que el intercambio de estas hélices por las correspondientes de Nf en las quimeras de la TP Phi29NfH1 y Phi29NfH3 altera la correcta orientación del subdominio *thumb*, afectando al desplazamiento de banda en la elongación del TP-dAMP.

5.2. La posición del residuo aromático del *priming-loop* está implicada en la selección del nucleótido en 3' utilizado como molde en la reacción de iniciación en ϕ 29

Basados en la presencia de residuos aromáticos cerca del residuo iniciador en el *priming-loop* de las TP de diferentes organismos que inician su replicación mediante proteína terminal, obtuvimos mutantes del *priming-loop* de la TP de ϕ 29 para estudiar el papel de estos residuos aromáticos en la elección del nucleótido usado como molde en la iniciación (Figura 56). Así, obtuvimos los mutantes E229Y y E228F/F230V donde alejamos el residuo aromático de la serina iniciadora.

Los resultados mostraron que el heterodímero formado por los mutantes iniciaba frente a la tercera posición, sugiriendo que el residuo aromático está actuando como una barrera

molecular que limita la internalización del extremo 3' de la cadena molde (Figura 56), condicionando el posicionamiento en el centro activo de polimerización del nucleótido molde correcto. Además, estos resultados excluyen el papel de la DNA polimerasa en el reconocimiento de la timina interna en 3'.

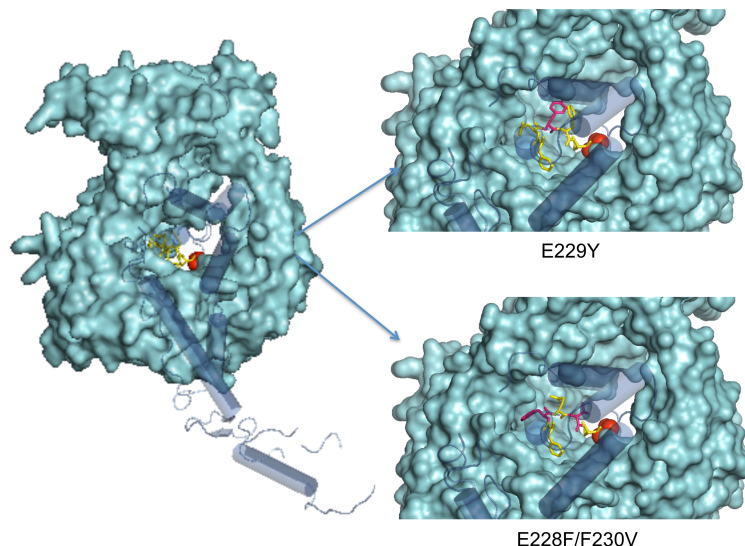


Figura 56: Modelado del *priming-loop* de la TP. La DNA polimerasa se representa en azul claro, la TP en azul oscuro, con el *priming-loop* en amarillo y la serina iniciadora en rojo. Se muestra ampliación de los mutantes, con los residuos cambiados en rosa.

El mutante E229Y presentó unos elevados niveles de iniciación, transición y replicación, incluso mejores que la TP *wild-type*. Sin embargo, parecía afectado en los ensayos de amplificación. Esto puede deberse a que una amplificación productiva *in vitro* del TP-DNA depende de un fino equilibrio entre los diferentes pasos de la replicación: iniciación, transición y elongación. Si este balance se ve afectado, debido tanto a mutaciones en la TP (del Prado *et al.*, 2012) como en la DNA polimerasa (de Vega *et al.*, 1998a), es esperable que la eficiencia de la amplificación disminuya.

En cuanto al mutante E228F/F230V, éste mostró una baja eficiencia usando TP-DNA como molde en todos los experimentos ensayados en presencia de magnesio. Por el contrario, estos niveles mejoraron cuando se utilizó como metal activador manganeso probablemente debido a el mayor radio iónico de éste (0.8 Å) con respecto al Mg^{2+} (0.66 Å). Además, los residuos Glu228 y Phe230 de la TP de $\phi 29$ son importantes en el mecanismo de *sliding-back* ya que el mutante E228F/F230V parece que es solo capaz de realizar un *sliding-back* para recuperar la información del segundo nucleótido en 3', pero no la del primer nucleótido.

6. Papel de la TP del heterodímero en el reconocimiento del origen de replicación

Estudios previos mostraron la existencia de interacciones funcionales entre la TP iniciadora y parental durante el reconocimiento del origen de replicación (del Prado *et al.*, 2012; Illana *et al.*, 1999; Serna-Rico *et al.*, 2000). Basándonos en estos datos, estudiamos qué parte de

la TP es la que estaría implicada en esta interacción durante el reconocimiento del origen de replicación. Para ello obtuvimos TPs quiméricas entre la TP de $\phi 29$ y los fagos relacionados Nf y GA-1.

6.1. La primera hélice α del dominio intermedio de la TP del heterodímero no parece estar implicada en el reconocimiento del origen de replicación

Estudios anteriores señalaron la región de la TP comprendida entre los residuos 84 y 118 como una hélice anfipática (Serna-Rico *et al.*, 2000). Basados en estos datos construimos TPs quiméricas en las que intercambiamos la primera hélice del dominio intermedio de la TP entre $\phi 29$ y los bacteriófagos Nf y GA-1.

Las quimeras resultantes no están afectadas en su papel como iniciadoras, pero los resultados mostraron que esta hélice no parece estar implicada en la interacción entre la TP parental e iniciadora durante el reconocimiento del origen de replicación ya que el cambio de hélice no implica un cambio en la especificidad en el reconocimiento del origen de replicación por el heterodímero. Para evaluar si esta hélice estaba jugando algún papel en el reconocimiento del origen de replicación en ausencia de la TP paterna, realizamos los mismos ensayos usando oligonucleótidos con la secuencia del origen de replicación del extremo derecho de los tres fagos en vez de TP-DNA. En este caso tampoco se observó un cambio en el reconocimiento del origen de replicación. Sin embargo, cuando la quimera Phi29Nf actúa como paterna se produce la inactivación del origen de replicación, indicando un posible papel de esta hélice en dicho reconocimiento por el heterodímero DNA polimerasa/TP.

6.2. El dominio N-terminal de la TP no juega un papel fundamental en el reconocimiento del origen de replicación

Para evaluar la implicación del dominio N-terminal de la TP en el reconocimiento del origen de replicación construimos dos quimeras intercambiando el dominio N-terminal de la TP entre los fagos $\phi 29$ y Nf. Como en el caso anterior, el cambio del N-terminal no afectó a la capacidad iniciadora de las quimeras, pero tampoco varió la especificidad en el reconocimiento del origen de replicación, ni en presencia ni en ausencia de la TP parental, por lo que podemos concluir que el dominio N-terminal de la TP no parece estar implicado en el reconocimiento del origen de replicación, ni en las interacciones entre la TP iniciadora y parental durante el reconocimiento del mismo.

Teniendo en cuenta estos resultados, y los estudios que demostraron la existencia de interacciones específicas entre la DNA polimerasa y la TP parental (González-Huici *et al.*, 2000b; Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007), parece que el reconocimiento de la TP parental se debe fundamentalmente a la DNA polimerasa del heterodímero.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1- Los residuos Arg158 y Arg169 del dominio intermedio de la TP de ϕ 29 contribuyen a la estabilidad del heterodímero DNA polimerasa/TP. El residuo Arg158 es fundamental para la interacción con la DNA polimerasa. El residuo Arg169 es crítico para mantener la correcta interacción requerida entre las TPs iniciadoras y parentales durante la iniciación de la replicación del TP-DNA.
- 2- Los residuos Glu191, Asp198, Tyr250, Glu252, Glu253 y Arg256 del dominio iniciador de la TP de ϕ 29 son importantes para una interacción funcional con la DNA polimerasa en el heterodímero.
- 3- El residuo Lys529 de la DNA polimerasa de ϕ 29 es importante en la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización y por lo tanto en la inserción del nucleótido entrante, así como en garantizar el paso de translocación requerido para la incorporación del siguiente nucleótido entrante.
- 4- La Lys529 regula la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa de ϕ 29, previniendo el exceso de degradación del sustrato.
- 5- El contacto directo entre la Lys529 (de la DNA polimerasa) y el Glu233 (de la TP) es requerido para la iniciación de la replicación del TP-DNA y su posterior translocación para completar la replicación del genoma.
- 6- Ensayos realizados con oligonucleótidos de banda simple y DNA reconstituido mostraron que la TP parental no parece estar jugando un papel esencial en dictar el nucleótido interno usado como molde en la reacción de iniciación.
- 7- El intercambio de las hélices del dominio iniciador de la TP de ϕ 29 por las correspondientes de Nf nos permitió concluir que las hélices en estudio no son las responsables de dictar la posición del molde utilizada para dirigir la reacción de iniciación por ellas mismas.
- 8- El residuo aromático Phe230 del *priming-loop* en ϕ 29 está implicado en el reconocimiento del nucleótido en 3' que sirve como molde en la reacción de iniciación, probablemente actuando como una barrera molecular que limita la internalización del extremo 3' de la cadena molde.

9- La primera hélice α del dominio intermedio de la TP de los fagos $\phi 29$, Nf y GA-1 no está implicada en el reconocimiento del origen de replicación, ya que el intercambio de esta hélice en las TPs de los fagos mencionados no varía su especificidad en el reconocimiento del origen.

10- Estudios realizados con quimeras de la TP de los bacteriófagos $\phi 29$ y Nf en las que se ha intercambiado el dominio N-terminal mostraron que este dominio no está implicado en el reconocimiento del origen de replicación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbotts J, SenGupta DN, Zmudzka B, Widen SG, Notario V, Wilson SH (1988) Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry* **27**: 901-909
- Baker TA, Bell SP (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* **92**: 295-305
- Bamford DH, Ravantti JJ, Ronnholm G, Laurinavicius S, Kukkaro P, Dyall-Smith M, Somerharju P, Kalkkinen N, Bamford JK (2005) Constituents of SH1, a novel lipid-containing virus infecting the halophilic euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *J Virol* **79**: 9097-9107
- Baños B, Lazaro JM, Villar L, Salas M, de Vega M (2008a) Characterization of a *Bacillus subtilis* 64-kDa DNA polymerase X potentially involved in DNA repair. *J Mol Biol* **384**: 1019-1028
- Baños B, Lazaro JM, Villar L, Salas M, de Vega M (2008b) Editing of misaligned 3'-termini by an intrinsic 3'-5' exonuclease activity residing in the PHP domain of a family X DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **36**: 5736-5749
- Beard WA, Wilson SH (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure* **11**: 489-496
- Bebenek A, Carver GT, Dressman HK, Kadyrov FA, Haseman JK, Petrov V, Konigsberg WH, Karam JD, Drake JW (2002) Dissecting the fidelity of bacteriophage RB69 DNA polymerase: site-specific modulation of fidelity by polymerase accessory proteins. *Genetics* **162**: 1003-1018
- Bebenek K, Beard WA, Darden TA, Li L, Prasad R, Luton BA, Gorenstein DG, Wilson SH, Kunkel TA (1997) A minor groove binding track in reverse transcriptase. *Nat Struct Biol* **4**: 194-197
- Bebenek K, Kunkel TA (1995) Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol* **262**: 217-232
- Bedford E, Tabor S, Richardson CC (1997) The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 479-484

Beese LS, Derbyshire V, Steitz TA (1993) Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* **260**: 352-355

Beese LS, Steitz TA (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* **10**: 25-33

Berman AJ, Kamtekar S, Goodman JL, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, Steitz TA (2007) Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J* **26**: 3494-3505

Bernad A, Blanco L, Lázaro JM, Martín G, Salas M (1989) A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**: 219-228

Bernad A, Zaballos A, Salas M, Blanco L (1987) Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J* **6**: 4219-4225

Bessman MJ, Kornberg A, Lehman IR, Simms ES (1956) Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* **21**: 197-198

Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**: 661-673

Blanco L, Bernad A, Blasco MA, Salas M (1991) A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* **100**: 27-38

Blanco L, Bernad A, Esteban JA, Salas M (1992) DNA-independent deoxynucleotidylation of the phi29 terminal protein by the phi29 DNA polymerase. *J Biol Chem* **267**: 1225-1230

Blanco L, Bernad A, Lázaro JM, Martín G, Garmendia C, Salas M (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage phi29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* **264**: 8935-8940

Blanco L, García JA, Salas M (1984) Cloning and expression of gene 2, required for the protein-primed initiation of the *Bacillus subtilis* phage phi29 DNA replication. *Gene* **29**: 33-40

Blanco L, Gutiérrez J, Lázaro JM, Bernad A, Salas M (1986) Replication of phage phi29 DNA in vitro: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res* **14**: 4923-4937

Blanco L, Lázaro JM, de Vega M, Bonnin A, Salas M (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12198-12202

Blanco L, Prieto I, Gutiérrez J, Bernad A, Lázaro JM, Hermoso JM, Salas M (1987) Effect of NH₄⁺ ions on ϕ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J Virol* **61**: 3983-3991

Blanco L, Salas M (1984) Characterization and purification of a phage ϕ 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5325-5329

Blanco L, Salas M (1985a) Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage ϕ 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **13**: 1239-1249

Blanco L, Salas M (1985b) Replication of phage ϕ 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length ϕ 29 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6404-6408

Blanco L, Salas M (1995) Mutational analysis of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol* **262**: 283-294

Blanco L, Salas M (1996) Relating structure to function in ϕ 29 DNA polymerase. *J Biol Chem* **271**: 8509-8512

Blasco MA, Bernad A, Blanco L, Salas M (1991) Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage ϕ 29 DNA polymerase. Involvement of amino acid motifs highly conserved in alpha-like DNA polymerases. *J Biol Chem* **266**: 7904-7909

Blasco MA, Blanco L, Parés E, Salas M, Bernad A (1990) Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage ϕ 29 DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **18**: 4763-4770

Blasco MA, Lázaro JM, Bernad A, Blanco L, Salas M (1992) ϕ 29 DNA polymerase active site. Mutants in conserved residues Tyr254 and Tyr390 are affected in dNTP binding. *J Biol Chem* **267**: 19427-19434

Blasco MA, Lázaro JM, Blanco L, Salas M (1993) ϕ 29 DNA polymerase active site. Residue Asp249 of conserved amino acid motif "Dx₂SLYP" is critical for synthetic activities. *J Biol Chem* **268**: 24106-24113

Bogenhagen DF, Pinz KG, Perez-Jannotti RM (2001) Enzymology of mitochondrial base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**: 257-271

Bollum FJ (1960) Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem* **235**: PC18-20

Boule JB, Rougeon F, Papanicolaou C (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J Biol Chem* **276**: 31388-31393

Bowman GD, Goedken ER, Kazmirski SL, O'Donnell M, Kuriyan J (2005) DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS letters* **579**: 863-867

Braithwaite DK, Ito J (1993) Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **21**: 787-802

Caldentey J, Blanco L, Bamford DH, Salas M (1993) *In vitro* replication of bacteriophage PRD1 DNA. Characterization of the protein-primed initiation site. *Nucleic Acids Res* **21**: 3725-3730

Caldentey J, Blanco L, Savilahti H, Bamford DH, Salas M (1992) *In vitro* replication of bacteriophage PRD1 DNA. Metal activation of protein-primed initiation and DNA elongation. *Nucleic Acids Res* **20**: 3971-3976

Cann IK, Komori K, Toh H, Kanai S, Ishino Y (1998) A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of *Euryarchaeota* possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14250-14255

Capson TL, Peliska JA, Kaboord BF, Frey MW, Lively C, Dahlberg M, Benkovic SJ (1992) Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry* **31**: 10984-10994

Carthew RW, Chodosh LA, Sharp PA (1985) An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* **43**: 439-448

- Chan SH, Yu AM, McVey M (2010) Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*. *PLoS Genet* **6**: e1001005
- Collins K, Mitchell JR (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene* **21**: 564-579
- Crespan E, Maga G, Hübscher U (2012) A new proofreading mechanism for lesion bypass by DNA polymerase-lambda. *EMBO reports* **13**: 68-74
- de Vega M, Blanco L, Salas M (1998a) ϕ 29 DNA polymerase residue Ser122, a single-stranded DNA ligand for 3'-5' exonucleolysis, is required to interact with the terminal protein. *J Biol Chem* **273**: 28966-28977
- de Vega M, Ilyina T, Lázaro JM, Salas M, Blanco L (1997) An invariant lysine residue is involved in catalysis at the 3'-5' exonuclease active site of eukaryotic-type DNA polymerases. *J Mol Biol* **270**: 65-78
- de Vega M, Lázaro JM, Salas M, Blanco L (1996) Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of ϕ 29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *EMBO J* **15**: 1182-1192
- de Vega M, Lázaro JM, Salas M, Blanco L (1998b) Mutational analysis of ϕ 29 DNA polymerase residues acting as ssDNA ligands for 3'-5' exonucleolysis. *J Mol Biol* **279**: 807-822
- de Vega M, Salas M (2012) Bacteriophage ϕ 29 DNA Polymerase: An Outstanding Replicase. In *Encyclopedia of DNA Research*, Nova Science Publishers: Properties and Modifications, Functions and Interactions, Recombination and Applications (ed), Vol.3 Chapter 11. 319-340 ISBN: 978-1-61324-305-3.
- del Prado A, Villar L, de Vega M, Salas M (2012) Involvement of residues of the ϕ 29 terminal protein intermediate and priming domains in the formation of a stable and functional heterodimer with the replicative DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **40**: 3886-3897
- Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* **3**: 461-467
- Dionne I, Nookala RK, Jackson SP, Doherty AJ, Bell SD (2003) A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Cell* **11**: 275-282

Domínguez O, Ruiz JF, Lain de Lera T, García-Díaz M, González MA, Kirchhoff T, Martínez AC, Bernad A, Blanco L (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J* **19**: 1731-1742

Donlin MJ, Patel SS, Johnson KA (1991) Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction. *Biochemistry* **30**: 538-546

Donmez I, Patel SS (2006) Mechanisms of a ring shaped helicase. *Nucleic Acids Res* **34**: 4216-4224

Doublie S, Sawaya MR, Ellenberger T (1999) An open and closed case for all polymerases. *Structure* **7**: R31-35

Doublie S, Tabor S, Long AM, Richardson CC, Ellenberger T (1998) Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* **391**: 251-258

Dufour E, Méndez J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M (2000) An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J Mol Biol* **304**: 289-300

Dufour E, Rodríguez I, Lázaro JM, de Vega M, Salas M (2003) A conserved insertion in protein-primed DNA polymerases is involved in primer terminus stabilisation. *J Mol Biol* **331**: 781-794

Esteban JA, Salas M, Blanco L (1993) Fidelity of ϕ 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem* **268**: 2719-2726

Esteban JA, Soengas MS, Salas M, Blanco L (1994) 3'-5' exonuclease active site of ϕ 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J Biol Chem* **269**: 31946-31954

Franklin MC, Wang J, Steitz TA (2001) Structure of the replicating complex of a pol α family DNA polymerase. *Cell* **105**: 657-667

Freemont PS, Friedman JM, Beese LS, Sanderson MR, Steitz TA (1988) Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8924-8928

Freudenthal BD, Beard WA, Shock DD, Wilson SH (2013) Observing a DNA polymerase choose right from wrong. *Cell* **154**: 157-168

Frick DN, Richardson CC (2001) DNA primases. *Annu Rev Biochem* **70**: 39-80

Friedberg EC, Wagner R, Radman M (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* **296**: 1627-1630

García-Díaz M, Domínguez O, López-Fernández LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Parraga M, García-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* **301**: 851-867

García-Gómez S, Reyes A, Martínez-Jiménez MI, Chocrón ES, Mourón S, Terrados G, Powell C, Salido E, Méndez J, Holt IJ, Blanco L (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Mol Cell* **52**: 541-553

Garg P, Burgers PM (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 115-128

Garmendia C, Bernad A, Esteban JA, Blanco L, Salas M (1992) The bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem* **267**: 2594-2599

Garmendia C, Hermoso JM, Salas M (1990) Functional domain for priming activity in the phage ϕ 29 terminal protein. *Gene* **88**: 73-79

González-Huici V, Lázaro JM, Salas M, Hermoso JM (2000a) Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J Biol Chem* **275**: 14678-14683

González-Huici V, Salas M, Hermoso JM (2000b) Sequence requirements for protein-primed initiation and elongation of phage ϕ 29 DNA replication. *J Biol Chem* **275**: 40547-40553

Goodman MF (1997) Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10493-10495

Goodman MF (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **71**: 17-50

Götte M, Li X, Wainberg MA (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**: 199-210

Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC (2006) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev* **106**: 383-405

Gutiérrez C, Martín G, Sogo JM, Salas M (1991) Mechanism of stimulation of DNA replication by bacteriophage ϕ 29 single-stranded DNA-binding protein p5. *J Biol Chem* **266**: 2104-2111

Gutiérrez J, García JA, Blanco L, Salas M (1986a) Cloning and template activity of the origins of replication of phage ϕ 29 DNA. *Gene* **43**: 1-11

Gutiérrez J, Vinós J, Prieto I, Méndez E, Hermoso JM, Salas M (1986b) Signals in the ϕ 29 DNA-terminal protein template for the initiation of phage ϕ 29 DNA replication. *Virology* **155**: 474-483

Hamdan S, Bulloch EM, Thompson PR, Beck JL, Yang JY, Crowther JA, Lilley PE, Carr PD, Ollis DL, Brown SE, Dixon NE (2002) Hydrolysis of the 5'-p-nitrophenyl ester of TMP by the proofreading exonuclease (epsilon) subunit of Escherichia coli DNA polymerase III. *Biochemistry* **41**: 5266-5275

Haracska L, Kondratieck CM, Unk I, Prakash S, Prakash L (2001) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol Cell* **8**: 407-415

Harding NE, Ito J (1980) DNA replication of bacteriophage ϕ 29: characterization of the intermediates and location of the termini of replication. *Virology* **104**: 323-338

Hermoso JM, Méndez E, Soriano F, Salas M (1985) Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage ϕ 29. *Nucleic Acids Res* **13**: 7715-7728

- Holguera I, Redrejo-Rodríguez M, Salas M, Muñoz-Espín D (2014) New insights in the ϕ 29 terminal protein DNA-binding and host nucleoid localization functions. *Mol Microbiol* **91**: 232-241
- Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA, Laue F, Ankenbauer W, Huber R, Angerer B (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3600-3605
- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* **282**: 1669-1675
- Illana B, Blanco L, Salas M (1996) Functional characterization of the genes coding for the terminal protein and DNA polymerase from bacteriophage GA-1. Evidence for a sliding-back mechanism during protein-primed GA-1 DNA replication. *J Mol Biol* **264**: 453-464
- Illana B, Lázaro JM, Gutiérrez C, Meijer WJ, Blanco L, Salas M (1999) Phage ϕ 29 terminal protein residues Asn80 and Tyr82 are recognition elements of the replication origins. *J Biol Chem* **274**: 15073-15079
- Illana B, Zaballos A, Blanco L, Salas M (1998) The RGD sequence in phage ϕ 29 terminal protein is required for interaction with ϕ 29 DNA polymerase. *Virology* **248**: 12-19
- Inciarte MR, Salas M, Sogo JM (1980) Structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 29. *J Virol* **34**: 187-199
- Indiani C, McInerney P, Georgescu R, Goodman MF, O'Donnell M (2005) A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Mol Cell* **19**: 805-815
- Ito J, Braithwaite DK (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res* **19**: 4045-4057
- Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clark AD, Jr., Lu X, Tantillo C, Williams RL, Kamer G, Ferris AL, Clark P, et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6320-6324

Johnson A, O'Donnell M (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* **74**: 283-315

Johnson KA (1993) Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu Rev Biochem* **62**: 685-713

Johnson SJ, Beese LS (2004) Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase. *Cell* **116**: 803-816

Joyce CM, Steitz TA (1994) Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **63**: 777-822

Joyce CM, Steitz TA (1995) Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol* **177**: 6321-6329

Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, Steitz TA (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. *Mol Cell* **16**: 609-618

Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Lázaro JM, de Vega M, Blanco L, Salas M, Steitz TA (2006) The phi29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J* **25**: 1335-1343

King AJ, van der Vliet PC (1994) A precursor terminal protein-trinucleotide intermediate during initiation of adenovirus DNA replication: regeneration of molecular ends in vitro by a jumping back mechanism. *EMBO J* **13**: 5786-5792

Klenow H, Overgaard-Hansen K (1970) Proteolytic cleavage of DNA polymerase from *Escherichia Coli B* into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS letters* **6**: 25-27

Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790

Kornberg A, Baker TA (1992) *DNA Replication*, second edn. New York: W.H. Freeman.

- Kumar JK, Chiu ET, Tabor S, Richardson CC (2004) A unique region in bacteriophage T7 DNA polymerase important for exonucleolytic hydrolysis of DNA. *J Biol Chem* **279**: 42018-42025
- Kunkel TA (2004) DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **279**: 16895-16898
- Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**: 497-529
- Kuriyan J, O'Donnell M (1993) Sliding clamps of DNA polymerases. *J Mol Biol* **234**: 915-925
- Lawrence CW (2004) Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem* **69**: 167-203
- Lázaro JM, Blanco L, Salas M (1995) Purification of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol* **262**: 42-49
- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **233**: 163-170
- Lehmann AR (2006) Clubbing together on clamps: The key to translesion synthesis. *DNA repair* **5**: 404-407
- Lin Q, Ma L, Burkhardt W, Spremulli LL (1994) Isolation and characterization of cDNA clones for chloroplast translational initiation factor-3 from *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **269**: 9436-9444
- Longás E, de Vega M, Lázaro JM, Salas M (2006) Functional characterization of highly processive protein-primed DNA polymerases from phages Nf and GA-1, endowed with a potent strand displacement capacity. *Nucleic Acids Res* **34**: 6051-6063
- Longás E, Villar L, Lázaro JM, de Vega M, Salas M (2008) Phage ϕ 29 and Nf terminal protein-priming domain specifies the internal template nucleotide to initiate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18290-18295

Longley MJ, Prasad R, Srivastava DK, Wilson SH, Copeland WC (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12244-12248

Martín AC, Blanco L, García P, Salas M, Méndez J (1996) *In vitro* protein-primed initiation of pneumococcal phage Cp-1 DNA replication occurs at the third 3' nucleotide of the linear template: a stepwise sliding-back mechanism. *J Mol Biol* **260**: 369-377

Martín G, Lázaro JM, Méndez E, Salas M (1989) Characterization of the phage ϕ 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in ϕ 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res* **17**: 3663-3672

McDonell MW, Simon MN, Studier FW (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **110**: 119-146

Mencia M, Gella P, Camacho A, de Vega M, Salas M (2011) Terminal protein-primed amplification of heterologous DNA with a minimal replication system based on phage ϕ 29. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 18655-18660

Méndez J, Blanco L, Esteban JA, Bernad A, Salas M (1992) Initiation of ϕ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9579-9583

Méndez J, Blanco L, Lázaro JM, Salas M (1994) Primer-terminus stabilization at the ϕ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif Tx2GR. *J Biol Chem* **269**: 30030-30038

Méndez J, Blanco L, Salas M (1997) Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J* **16**: 2519-2527

Minnick DT, Astatke M, Joyce CM, Kunkel TA (1996) A thumb subdomain mutant of the large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity. *J Biol Chem* **271**: 24954-24961

Moelling K, Bolognesi DP, Bauer H (1971) Polypeptides of avian RNA tumor viruses. 3. Purification and identification of a DNA synthesizing enzyme. *Virology* **45**: 298-302

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**: 665-679

Mourón S, Rodríguez-Acebes S, Martínez-Jiménez MI, García-Gómez S, Chocrón S, Blanco L, Méndez J (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nature structural & molecular biology* **20**: 1383-1389

Muñoz-Espín D, Holguera I, Ballesteros-Plaza D, Carballido-López R, Salas M (2010) Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16548-16553

Nakamura T, Zhao Y, Yamagata Y, Hua YJ, Yang W (2012) Watching DNA polymerase eta make a phosphodiester bond. *Nature* **487**: 196-201

Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* **272**: 1646-1649

Oliveros M, Yáñez RJ, Salas ML, Salas J, Viñuela E, Blanco L (1997) Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem* **272**: 30899-30910

Ollis DL, Brick P, Hamlin R, Xuong NG, Steitz TA (1985) Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* **313**: 762-766

Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* **41**: 181-190

Pelletier H, Sawaya MR, Kumar A, Wilson SH, Kraut J (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science* **264**: 1891-1903

Peñalva MA, Salas M (1982) Initiation of phage $\phi 29$ DNA replication in vitro: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5522-5526

Pérez-Arnaiz P, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2006) Involvement of ϕ 29 DNA polymerase thumb subdomain in the proper coordination of synthesis and degradation during DNA replication. *Nucleic Acids Res* **34**: 3107-3115

Pérez-Arnaiz P, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2009) Functional importance of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase residue Tyr148 in primer-terminus stabilisation at the 3'-5' exonuclease active site. *J Mol Biol* **391**: 797-807

Pérez-Arnaiz P, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2010) ϕ 29 DNA polymerase active site: role of residue Val250 as metal-dNTP complex ligand and in protein-primed initiation. *J Mol Biol* **395**: 223-233

Pérez-Arnaiz P, Longás E, Villar L, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2007) Involvement of phage ϕ 29 DNA polymerase and terminal protein subdomains in conferring specificity during initiation of protein-primed DNA replication. *Nucleic Acids Res* **35**: 7061-7073

Pomerantz RT, O'Donnell M (2007) Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol* **15**: 156-164

Redrejo-Rodríguez M, Muñoz-Espín D, Holguera I, Mencía M, Salas M (2012) Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 18482-18487

Redrejo-Rodríguez M, Muñoz-Espín D, Holguera I, Mencía M, Salas M (2013) Nuclear and nucleoid localization are independently conserved functions in bacteriophage terminal proteins. *Mol Microbiol* **90**: 858-868

Rodríguez AC, Park HW, Mao C, Beese LS (2000) Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J Mol Biol* **299**: 447-462

Rodríguez I, Lázaro JM, Blanco L, Kamtekar S, Berman AJ, Wang J, Steitz TA, Salas M, de Vega M (2005) A specific subdomain in ϕ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6407-6412

Rodríguez I, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2003) ϕ 29 DNA polymerase residue Phe128 of the highly conserved (S/T)L_xh motif is required for a stable and functional interaction with the terminal protein. *J Mol Biol* **325**: 85-97

Rodríguez I, Lázaro JM, Salas M, de Vega M (2004) ϕ 29 DNA polymerase-terminal protein interaction. Involvement of residues specifically conserved among protein-primed DNA polymerases. *J Mol Biol* **337**: 829-841

Rothwell PJ, Waksman G (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* **71**: 401-440

Ruiz JF, Juarez R, García-Díaz M, Terrados G, Picher AJ, Gonzalez-Barrera S, Fernandez de Henestrosa AR, Blanco L (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol μ requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res* **31**: 4441-4449

Salas M (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**: 39-71

Salas M (1999) Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet Eng (N Y)* **21**: 159-171

Salas M, Mellado RP, Viñuela E, Sogo JM (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29. *J Mol Biol* **119**: 269-291

Salas M, Miller J, Leis J, DePamphilis M (1996) *Mechanisms for Priming DNA Synthesis*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos E, Lázaro JM, Pérez-Arnaiz P, Salas M, de Vega M (2014) Role of the LEXE motif of protein-primed DNA polymerases in the interaction with the incoming nucleotide. *J Biol Chem* **289**: 2888-2898

Saturno J, Lázaro JM, Esteban FJ, Blanco L, Salas M (1997) ϕ 29 DNA polymerase residue Lys383, invariant at motif B of DNA-dependent polymerases, is involved in dNTP binding. *J Mol Biol* **269**: 313-325

Sawaya MR, Prasad R, Wilson SH, Kraut J, Pelletier H (1997) Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry* **36**: 11205-11215

Schaaper RM (1993) Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 23762-23765

Schlegel RA, Thomas CA, Jr. (1972) Some special structural features of intracellular bacteriophage T7 concatemers. *J Mol Biol* **68**: 319-345

Serna-Rico A, Illana B, Salas M, Meijer WJ (2000) The putative coiled coil domain of the ϕ 29 terminal protein is a major determinant involved in recognition of the origin of replication. *J Biol Chem* **275**: 40529-40538

Serrano M, Gutiérrez C, Freire R, Bravo A, Salas M, Hermoso JM (1994) Phage ϕ 29 protein p6: a viral histone-like protein. *Biochimie* **76**: 981-991

Serrano M, Salas M, Hermoso JM (1990) A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science* **248**: 1012-1016

Shamoo Y, Steitz TA (1999) Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* **99**: 155-166

Soengas MS, Esteban JA, Lázaro JM, Bernad A, Blasco MA, Salas M, Blanco L (1992) Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of ϕ 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *EMBO J* **11**: 4227-4237

Soengas MS, Gutiérrez C, Salas M (1995) Helix-destabilizing activity of ϕ 29 single-stranded DNA binding protein: effect on the elongation rate during strand displacement DNA replication. *J Mol Biol* **253**: 517-529

Sogo JM, García JA, Peñalva MA, Salas M (1982) Structure of protein-containing replicative intermediates of *Bacillus subtilis* phage ϕ 29 DNA. *Virology* **116**: 1-18

Steitz TA (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* **274**: 17395-17398

Steitz TA, Smerdon SJ, Jager J, Joyce CM (1994) A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* **266**: 2022-2025

- Steitz TA, Yin YW (2004) Accuracy, lesion bypass, strand displacement and translocation by DNA polymerases *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 17-23
- Taylor K, Wegrzyn G (1995) Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 109-119
- Truniger V, Lázaro JM, Blanco L, Salas M (2002) A highly conserved lysine residue in ϕ 29 DNA polymerase is important for correct binding of the templating nucleotide during initiation of ϕ 29 DNA replication. *J Mol Biol* **318**: 83-96
- Truniger V, Lázaro JM, Salas M (2004) Function of the C-terminus of ϕ 29 DNA polymerase in DNA and terminal protein binding. *Nucleic Acids Res* **32**: 361-370
- Truniger V, Lázaro JM, Salas M, Blanco L (1996) A DNA binding motif coordinating synthesis and degradation in proofreading DNA polymerases. *EMBO J* **15**: 3430-3441
- Uchiyama Y, Takeuchi R, Kodera H, Sakaguchi K (2009) Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie* **91**: 165-170
- Uemori T, Sato Y, Kato I, Doi H, Ishino Y (1997) A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells* **2**: 499-512
- Wang J, Sattar AK, Wang CC, Karam JD, Konigsberg WH, Steitz TA (1997) Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* **89**: 1087-1099
- Watson JD (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**: 197-201
- Wold MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* **66**: 61-92
- Wong I, Patel SS, Johnson KA (1991) An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry* **30**: 526-537

Yamanaka K, Minko IG, Takata K, Kolbanovskiy A, Kozekov ID, Wood RD, Rizzo CJ, Lloyd RS (2010) Novel enzymatic function of DNA polymerase η in translesion DNA synthesis past major groove DNA-peptide and DNA-DNA cross-links. *Chem Res Toxicol* **23**: 689-695

Yang W (2003) Damage repair DNA polymerases γ . *Curr Opin Struct Biol* **13**: 23-30

Yoon JH, Roy Choudhury J, Park J, Prakash S, Prakash L (2014) A role for DNA polymerase θ in promoting replication through oxidative DNA lesion, thymine glycol, in human cells. *J Biol Chem* **289**: 13177-13185

Zaballos A, Lázaro JM, Méndez E, Mellado RP, Salas M (1989) Effects of internal deletions on the priming activity of the phage ϕ 29 terminal protein. *Gene* **83**: 187-195

Zakharova E, Wang J, Konigsberg W (2004) The activity of selected RB69 DNA polymerase mutants can be restored by manganese ions: the existence of alternative metal ion ligands used during the polymerization cycle. *Biochemistry* **43**: 6587-6595

Zhao Y, Jeruzalmi D, Moarefi I, Leighton L, Lasken R, Kuriyan J (1999) Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure* **7**: 1189-1199

Zhou BL, Pata JD, Steitz TA (2001) Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell* **8**: 427-437